

**Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von  
Proopiomelanocortin-Fragmenten:**

**Nachweis spezifischer Bindungsstellen für  $\beta_H$ -Endorphin auf  
Keratinozyten und Vitronektin in Keratinozyten-Kulturen der Zelllinie  
HaCaT**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Egeling, Katharina Thea  
aus Bremen**

**Gießen 2003**

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-  
Universität Gießen des Fachbereichs Humanmedizin

Direktor/Leiter: Prof. Dr. H. Schmidt  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher

Gutachter: Prof. Dr. K.T. Preissner

Tag der Disputation: 24.09.2003

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Exogene und endogene Opioide .....	1
1.1.1	Exogene Opioide: Opiate .....	1
1.1.2	Endogene Opioide: Opioidpeptide .....	2
1.2	Biosynthese, Struktur und Vorkommen des $\beta$ -Endorphins .....	2
1.2.1	Biosynthese des $\beta$ -Endorphins und anderer POMC-Derivate .....	2
1.2.2	Struktur des $\beta$ -Endorphins .....	4
1.2.3	Vorkommen des $\beta$ -Endorphins und anderer POMC-Derivate .....	5
1.3	Funktionelle Bedeutung des $\beta$ -Endorphins.....	6
1.3.1	Opioidebindungsstellen (Opioide-Rezeptoren) und Non-Opioide- Bindungsstellen des $\beta$ -Endorphins.....	6
1.3.1.1	Opioide-Bindungsstellen (Opioide-rezeptoren) .....	6
1.3.1.2	Non-Opioide-Bindungsstellen auf Zellen .....	7
1.3.1.3	Non-Opioide-Bindungsstellen auf Makromolekülen: Vitronektin.....	8
1.3.1.3.1	Adhäsivproteine und Zelladhäsionsmoleküle .....	8
1.3.1.3.2	Nachweis des Vitronektins .....	9
1.3.1.3.3	Struktur des Vitronektins .....	10
1.3.1.3.4	Vorkommen und Funktion .....	13
1.3.1.3.5	Interaktion mit $\beta$ -Endorphin .....	17
1.3.2	Mögliche Funktionen des $\beta$ -Endorphins im ZNS .....	18
1.3.3	Mögliche Funktionen des $\beta$ -Endorphins in peripheren Organen .....	20
1.3.4	Mögliche Funktionen des $\beta$ -Endorphins in der Haut .....	21
1.3.4.1	Nachweis von $\beta$ -Endorphin und POMC-Fragmenten in der Haut.....	22
1.3.4.2	Nachweis von $\beta$ -Endorphin-Bindungsstellen in der Haut .....	23
1.3.4.3	Nachweis und Bedeutung von Vitronektin in der Haut .....	24
2	Aufgabenstellung .....	26
3	Geräte, Materialien, Substanzen, Lösungen, Computerprogramme .....	28

3.1	Geräte und Materialien .....	28
3.2	Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen .....	29
3.3	Lösungen.....	31
3.4	Computerprogramme .....	31
4	Methoden .....	32
4.1	Untersuchungen zu Nachweis und Charakterisierung der Bindung von $\beta_H$ - Endorphin(1-31) an Keratinozyten und weitere Bestandteile von Keratinozytenzellkulturen .....	32
4.1.1	Binder und Liganden .....	32
4.1.1.1	Binder.....	32
4.1.1.1.1	Keratinozyten .....	32
4.1.1.1.1.1	Keratinozytenzelllinie HaCaT .....	32
4.1.1.1.1.2	Züchtung adhärenter Keratinozyten in HaCaT-Zellkulturen.....	33
4.1.1.1.1.3	Herstellung einer Zellsuspension aus HaCaT-Zellkulturen.....	33
4.1.1.1.1.4	Zellzählung.....	34
4.1.1.1.2	Nicht-zelluläre Bestandteile von Keratinozytenzellkulturen .....	35
4.1.1.1.2.1	Nicht identifizierte Binder von $\beta_H$ -Endorphin in der HaCaT- Zellkultur.....	35
4.1.1.1.2.2	Identifizierte Binder von $\beta_H$ -Endorphin in der HaCaT- Zellkultur: Vitronectin.....	35
4.1.1.1.2.2.1	Identifizierung über Bindungscharakteristika .....	36
4.1.1.1.2.2.2	Identifizierung über Fluoreszenzmikroskopie .....	36
4.1.1.2	Liganden .....	37
4.1.1.2.1	Nicht markierte Peptide.....	38
4.1.1.2.2	Radioaktiv markierte Peptide .....	38
4.1.1.2.2.1	Markierung mit $^{125}$ Jod .....	38
4.1.1.2.2.2	Einsatz der radioaktiv markierten Peptide .....	39
4.1.2	Bindungsversuche mit Keratinozytenzellkulturen .....	39
4.1.2.1	Suche nach Bindungsstellen für $\beta_H$ -Endorphin in Keratinozytenzellkulturen: Nachweis der Bindung an Vitronectin.....	39
4.1.2.1.1	Versuchsdurchführung .....	40

4.1.2.1.2 Inkubationsansätze .....	40
4.1.2.1.3 Auswertung .....	42
4.1.2.2 Suche nach Bindungsstellen für $\beta_H$ -Endorphin auf adhären- ten Keratinozyten in Zellkultur (unter Ausschluß der Bindung an Vitronektin) .....	43
4.1.2.2.1 Abdeckung der Vitronektin-Bindungsstelle.....	43
4.1.2.2.2 Versuchsdurchführung .....	44
4.1.2.2.3 Inkubationsansätze .....	45
4.1.2.2.4 Auswertung .....	45
4.1.3 Bindungsversuche mit Keratinozyten in Suspension.....	45
4.1.3.1 Versuchsdurchführung .....	46
4.1.3.2 Inkubationsansätze .....	46
4.1.3.3 Auswertung .....	48
4.1.4 Charakterisierung der spezifischen Bindung von $\beta_H$ -Endorphin.....	49
4.2 Untersuchung zur Freisetzung von $\beta_H$ -Endorphin, N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin und [Arginin <sup>8</sup> ]Vasopressin.....	51
4.2.1 Stimulation adhärenter Keratinozyten (HaCaT) in Zellkultur .....	51
4.2.1.1 Kultivierung der Zellen .....	51
4.2.1.2 UVB-Bestrahlung der Zellkultur.....	51
4.2.2 Aufarbeitung der Zellen und der Zellkultur-Überstände.....	52
4.2.2.1 Herstellung von Proben aus Zellkulturüberständen.....	52
4.2.2.2 Herstellung von Zellysaten.....	53
4.2.3 Extraktion von Zellkultur-Überständen und Zellysaten .....	54
4.2.3.1 Durchführung des Extraktionsverfahrens .....	54
4.2.3.2 Standardisierung des Extraktionsverfahrens.....	54
4.2.3.2.1 Gewinnung von Zellen und Zellkultur-Überständen .....	55
4.2.3.2.2 Ansetzen und Extraktion von Extraktionsstandardproben.....	55
4.2.4 Analyse der Extrakte mittels Radioimmunoassay (RIA) .....	56
4.2.4.1 Herstellung eines polyklonalen Antiserums zwecks Einsatz in einem One-Site Fluid Phase-RIA .....	56
4.2.4.1.1 Antigen.....	56
4.2.4.1.2 Kopplung des Antigens mit einem Trägerprotein .....	57
4.2.4.1.3 Immunisierung der Kaninchen.....	57
4.2.4.1.4 Titerbestimmung.....	58

4.2.4.2 Radioimmunoassays (RIA) für $\beta_H$ -Endorphin(1-31), N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin(1-31) und [Arginin <sup>8</sup> ]Vasopressin.....	58
4.2.4.2.1 Durchführung .....	58
4.2.4.2.2 Inkubationsansatz .....	59
4.2.4.2.3 Auswertung .....	60
 5 Ergebnisse .....	 62
5.1 Nachweis spezifischer, nicht zellulärer Bindungsstellen für $\beta_H$ - Endorphin in Keratinozytenzellkulturen .....	62
5.1.1 Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an nicht identifizierte Bindungsstellen in Keratinozytenkulturen .....	62
5.1.2 Nachweis der Charakteristika einer $\beta_H$ -Endorphin/Vitronektin- Interaktion .....	64
5.1.2.1 Zeitabhängigkeit.....	65
5.1.2.2 Reversibilität.....	66
5.1.2.3 Sättigbarkeit .....	67
5.1.2.4 Bindungsparameter $K_D$ und $B_{Max}$ .....	68
5.1.2.5 Strukturspezifität .....	69
5.1.3 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Vitronektin.....	71
5.2 Nachweis spezifischer Bindungsstellen für $\beta_H$ -Endorphin auf adhären- ten Keratinozyten in Keratinozytenzellkulturen.....	73
5.2.1 Vorversuche .....	74
5.2.2 Blockade der $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle auf Vitronektin.....	75
5.2.3 Charakteristika der Bindung.....	76
5.2.3.1 Sättigbarkeit .....	76
5.2.3.2 Bindungsparameter $K_D$ und $B_{MAX}$ .....	77
5.2.3.3 Strukturspezifität .....	78
5.3 Nachweis spezifischer Bindungsstellen für $\beta_H$ -Endorphin auf Keratinozyten in Suspension.....	80
5.3.1 Optimierung der Versuchsdurchführung .....	80
5.3.1.1 Zellpräparation .....	80
5.3.1.2 Inkubationstemperatur .....	82

5.3.2	Strukturspezifität der Bindung .....	83
5.4	Ergebnisse weiterführender Untersuchungen zur Freisetzung von $\beta_H$ - Endorphin und weiteren Peptiden aus Keratinozyten .....	85
5.4.1	$\beta_H$ -Endorphin-immunoreaktives Material.....	86
5.4.2	N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin(1-31)-immunoreaktives Material.....	88
5.4.3	[Arginin <sup>8</sup> ]Vasopressin-immunoreaktives Material .....	90
6	Diskussion.....	93
6.1	Methoden .....	93
6.1.1	Untersuchungen zu Nachweis und Charakterisierung der Bindung von $\beta_H$ -Endorphin(1-31) an Keratinozyten und Vitronectin aus Keratinozytenkulturen .....	93
6.1.1.1	Auswahl der Keratinozytenzelllinie HaCaT .....	93
6.1.1.2	Bindungsversuche.....	95
6.1.1.2.1	Bindungsversuche mit Keratinozytenkulturen .....	95
6.1.1.2.1.1	Blockade unspezifischer Bindungsstellen .....	95
6.1.1.2.1.2	Blockade der C-terminalen $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle auf Vitronectin .....	96
6.1.1.2.1.3	Vorbereitung und Inkubation der Versuchsansätze.....	97
6.1.1.2.1.4	Negativkontrolle (Blank) .....	97
6.1.1.2.2	Untersuchung der Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an Keratinozyten in Suspension.....	98
6.1.1.2.2.1	Konvektion der Reaktionsansätze während der Inkubationszeit .....	99
6.1.1.2.2.2	Zentrifugation der Reaktionsansätze.....	99
6.1.1.2.2.3	Negativkontrolle (Blank) .....	99
6.1.1.3	Untersuchungen zur Freisetzung von $\beta_H$ -Endorphin, N-Acetyl- $\beta_H$ - Endorphin und [Arginin <sup>8</sup> ]Vasopressin aus Keratinozyten der Zelllinie HaCaT.....	100
6.1.1.3.1	Auswahl der Zellen.....	100
6.1.1.3.2	Zellpräparation .....	100

6.2	Ergebnisse .....	101
6.2.1	Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an Vitronektin in Keratinozytenzellkulturen .....	101
6.2.2	Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an Keratinozyten der Zelllinie HaCaT .....	103
6.2.2.1	Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an adh�rente Keratinozyten in Keratinozytenzellkulturen .....	103
6.2.2.2	Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an Keratinozyten in Suspension.....	104
6.2.2.3	Vergleich der Strukturspezifität der Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an adhärenten Zellen und an Zellen in Suspension der Keratinozytenzelllinie HaCaT .....	105
6.2.3	Die Bindungsstelle des $\beta_H$ -Endorphin-Mittelfragments – eine „Subsite“ des Chemokin-Rezeptors CCR5? .....	106
6.2.4	Die physiologische Bedeutung einer $\beta_H$ -Endorphin-/Vitronektin- Interaktion in der Haut.....	108
6.3	Proopiomelanocortin (POMC) und seine Fragmente in der Haut .....	109
6.3.1	Expression von POMC in Hautzellen .....	109
6.3.2	Freisetzung von POMC-Fragmenten aus Hautzellen.....	110
6.3.3	Freisetzung von [Arginin <sup>8</sup> ]Vasopressin aus Hautzellen.....	112
7	Zusammenfassung.....	113
8	Literaturverzeichnis .....	116
9	Lebenslauf .....	144
10	Danksagungen.....	147



## Abkürzungsverzeichnis

### Aminosäuren:

Ala	Alanin
Asn	Asparagin
Arg	Arginin
Cys	Cystein
Gln	Glutamin
Glu	Gutaminsäure
Gly	Glycin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AVP	Arginin-Vasopressin
bFGF	basischer Fibroblasten- Wachstumsfaktor
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin	humanes $\beta$ -Endorphin
B <sub>MAX</sub>	Maximale Bindung, Konzentration an Bindungsstellen
$\beta$ -LPH	$\beta$ -Lipotropin
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius

CAM	Zelladhäsionsmoleküle
cAMP	cyclo-AMP
CBS	Carbonate buffered saline
CDI	Carbodiimid[1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)]
CLIP	Corticotropin-like intermediate lobe peptide
ConA	Concanvalin A
cpm	counts per minute
CRH	Corticotropin releasing hormone
DABCO	(1,4-diazodicyclo[2.2.2.]octane)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DPBS	Dulbecco`s Phosphate-buffered saline
EBDA	equilibrium binding data analysis
FCS	fetales Kälberserum
FP RIA	Fluid Phase Radioimmunoassay
HIV	human immunodeficiency virus
IL	Interleukin
IRM	Immunoreaktives Material
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
KLH	Hämocyanin
MIF	Makrophagen-Inhibitor-Faktor
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NGS	normal goat serum
PAI-1	Plasmin-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
POMC	Proopiomelanocortin
RIA	Radioimmunoassay
SD	Standardabweichung
SERPINE	Serinprotease-Inhibitoren
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor- $\alpha$
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

TPA	(phorbol 12-tetradecanoate 13-acetate)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
$\bar{x}$	Mittelwert
ZNS	Zentrales Nervensystem

**Dimensionen:**

Ci	Curie
cpm	counts per minute
Da	Dalton
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
Jh.	Jahrhundert
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
M	molar (Mole/l)
min	Minuten
sec	Sekunden
v/v	volume/volume (Volumenverhältnis zweier Flüssigkeiten in einem Gemisch)
w/v	volume/weight (Masse eine gelösten Stoffes pro Volumen des Lösungsmittels)

# 1 Einleitung

## 1.1 Exogene und endogene Opioide

### 1.1.1 Exogene Opioide: Opiate

Schon im 3. Jahrtausend vor Chr. wurde der Schlafmohn (*Papaver somniferum*) von den Sumerern im Zweistromland zwischen Tigris und Euphrat zur Opiumgewinnung kultiviert. Opium wird aus dem an der Luft getrockneten Milchsafte der Fruchtkapsel gewonnen und wurde wegen seiner analgetischen Wirkung geschätzt. Es verbreitete sich in der damals bekannten Welt und kam u.a. nach Ägypten und Griechenland. Beschrieben wird es z.B. im Jh. vor Chr. von dem griechischen Arzt Pedanicus Dioskurides in seiner „De Materia Medica“, dem klassischen pharmakologischen Lehrbuch der damaligen Zeit. Berühmt wurde Opium in Mitteleuropa als Laudanum durch Paracelsus im 16. Jh.

Opium enthält ca. 25 Alkaloide. Zu den pharmakologisch bedeutsamsten gehören die vom Phenanthren- (Morphin, Codein, Thebain) und vom Benzylisochinolin-Typ (Papaverin, Noscapin).

1806 gelang dem Apotheker Friedrich Sertürner die Isolierung des ersten Alkaloids, des Morphins (benannt nach dem griechischen Gott der Träume Morpheus) und er erkannte dessen pharmakologische Potenz (*Sertürner, 1806*).

Um die Jahrhundertwende wurde dann das Heroin synthetisiert und lange Zeit als Hustenmittel verwendet.

1923 gelang die Aufklärung der chemischen Struktur des Morphins (*Gulland and Robinson, 1923*) und 1952 die erste de novo-Synthese (*Gates and Tschudi, 1952*).

Die Wirkung der Opiate wird über spezifische Rezeptoren vermittelt, denen auch körpereigene endogene Liganden zugeordnet sind. So unterscheidet man heute die Opiate als exogene von den endogenen Opioiden.

Einen Überblick über die Geschichte der Opioide und Opioidrezeptoren ist zu finden bei Brownstein (1993).

### 1.1.2 Endogene Opiode: Opioidpeptide

Nach der Entdeckung der ersten spezifischen Opiatrezeptoren 1973 (*Pert and Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973*) wurde die Suche nach den körpereigenen Liganden, den endogenen Opioiden, verstärkt. In der Tat gelang wenig später der Nachweis einiger endogener Opiode, bei denen es sich ausnahmslos um Peptide handelte.

1975 entdeckten John Hughes und Hans Kosterlitz die ersten Vertreter dieser Substanzklasse und benannten diese nach ihrem Herkunftsort, dem Gehirn, Enkephaline (*Huges, 1975*). Ein Jahr später wurde das  $\beta$ -Endorphin gefunden (*Li et al., 1976*) und weitere drei Jahre später das Dynorphin (*Goldstein, 1979*).

In Säugern existieren drei verschiedene Precursormoleküle für die Opioidpeptide: Proenkephalin, Prodynorphin und Proopiomelanocortin. Die Biosynthese erfolgt über das jeweilige Prä-Propeptid und das Propeptid unterliegt posttranslationaler Prozessierung. Aus dem Precursormolekül Prä-Proenkephalin entstehen Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin, aus dem Prä-Prodynorphin Dynorphin und Neoendorphine. Aus dem wohl bekanntesten Precursormolekül Prä-Proopiomelanocortin (POMC) entstehen die Endorphine und andere biologisch aktive Peptide wie ACTH (Adrenocorticotropes Hormon),  $\alpha$ -MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon),  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH und  $\beta$ -LPH ( $\beta$ -Lipotropin) (*Young et al., 1993*).

Alle endogenen Opioidpeptide besitzen die N-terminale Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-X, wobei X entweder Methionin oder Leucin ist. Über diese Aminosäuresequenz erfolgt die Bindung an den Opioidrezeptor.

## 1.2 Biosynthese, Struktur und Vorkommen des $\beta$ -Endorphins

### 1.2.1 Biosynthese des $\beta$ -Endorphins und anderer POMC-Derivate

Das POMC Gen setzt sich aus drei Exons, die jeweils durch ein Intron voneinander getrennt werden, zusammen. Das erste Exon enthält den 5'-nicht translatierten Abschnitt der POMC mRNA. Das zweite kodiert das Signalpeptid und die ersten 18

Aminosäuren des POMC. Exon drei kodiert den Rest des POMC mit den Sequenzen von  $\beta$ -Endorphin,  $\alpha$ -, $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH, ACTH und  $\beta$ -Lipotropin. Das POMC-Molekül des Menschen besteht aus 267 Aminosäureresten und durch posttranslationale Abspaltung der 31 C-terminalen Aminosäurereste entsteht das  $\beta$ -Endorphin(1-31) (De Bold et al., 1988; Oates et al., 1988; Van Woudenberg, 1991)

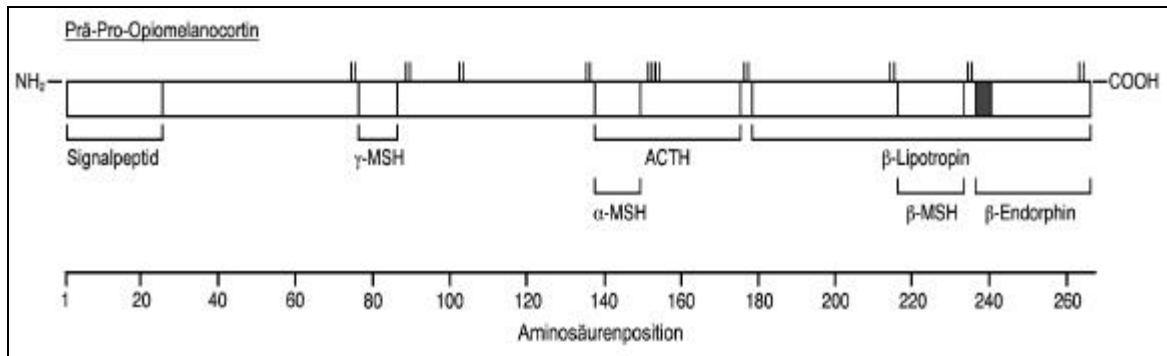
Durch weitere Spaltung entstehen weitere  $\beta$ -Endorphin-Fragmente, zum Teil mit biologischer Aktivität, wie  $\beta$ -Endorphin(1-27), (1-26),  $\alpha$ -Endorphin [ $\beta$ -Endorphin(1-16)] und  $\gamma$ -Endorphin [ $\beta$ -Endorphin(1-17)], die auch N-terminal acetyliert sein können.

Bei niederen Spezies, z.B. der Ratte, wird das POMC Gen im Hypophysenvorderlappen und Intermediärlappen exprimiert: Man unterscheidet corticotrophe Zellen, die im Hypophysenvorderlappen lokalisiert sind, von melanotrophen Zellen im Intermediärlappen (Eipper and Mains, 1981). Die Endprodukte in den corticotrophen Zellen sind ACTH,  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -Endorphin und ein 16 kDa-Fragment, welches u.a. die Sequenz des  $\gamma$ -MSH beinhaltet. Die Freisetzung dieser biologisch aktiven Peptide erfolgt durch enzymatische Abspaltung vom Vorläufermolekül. Basenpaare sind Angriffsstellen für die spaltenden Enzyme. Die Expression des Vorläufermoleküls sowie die Freisetzung der biologisch aktiven Peptide lassen sich u.a. durch CRH und Arginin Vasopressin steigern und werden durch Glukocorticoide gehemmt (Young et al., 1993).

In den melanotrophen Zellen ist die Abspaltung der biologisch aktiven Peptide im Gegensatz zu den corticotrophen Zellen nicht an bestimmte Basenpaare gebunden, die proteolytische Spaltung ist komplexer und es entstehen kleinere Peptide.

Produkte des melanotrophen Systems sind z.B.  $\alpha$ -MSH, CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide) und Acetyl- $\beta$ -Endorphin (Eipper and Mains, 1980).

Beim Menschen liegt der Zwischenlappen nur in rudimentärer Form vor. Die im Vorderlappen das POMC exprimierenden Zellen verfügen über das corticotrophe wie über das melanotrophe Processierungssystem.



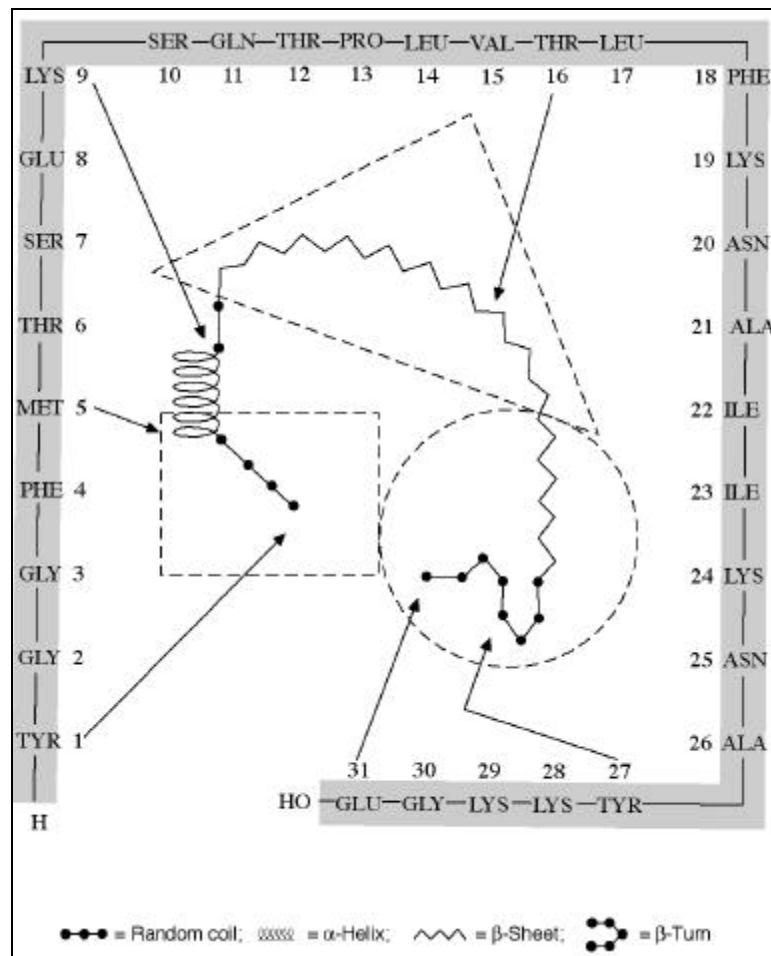
**Abb.1** Prä-Pro-Opiomelanotropin und Spaltprodukte (nach Starke, K., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 1996)

### 1.2.2 Struktur des $\beta$ -Endorphins

$\beta$ -Endorphin entsteht durch posttranslationale enzymatische Abspaltung des 31 Aminosäurereste umfassenden C-terminalen Fragmentes von POMC. Die Struktur des Peptids setzt sich wie folgt zusammen (nach *Kaiser and Kèzdy, 1984*):

- N-Terminus mit der typischen Opioid-Erkennungssequenz (Tyr-Gly-Gly-Phe )  
Über den N-Terminus erfolgt die Interaktion mit dem Opioid-Rezeptor, der Tyrosinrest in Position 1 ist für die Bindung essentiell (*Deakin et al., 1980; Akil et al., 1981*)
- Hydrophile Spacerregion (Aminosäurereste 6-12)
- Der Rest beinhaltet eine 16 Aminosäuren lange Sequenz, die eine amphiphile  $\alpha$ - oder  $\pi$ -Helix formen kann.

Der C-Terminus beeinflusst die Affinität des Moleküls zum Rezeptor und ist für die Bindung des  $\beta$ -Endorphins an Vitronektion (*Hildebrand et al., 1989*) von entscheidender Bedeutung.



**Abb.2** Primär- und Sekundärstruktur des humanen  $\beta$ -Endorphin(1-31) in Anlehnung an Li, C.H.:  
Synthetic analogs and structure-activity relationships (1981)

### 1.2.3 Vorkommen des $\beta$ -Endorphins und anderer POMC-Derivate

POMC und seine Spaltprodukte kommen außerhalb des Gehirns hauptsächlich in der Adenohypophyse vor, im Gehirn hauptsächlich im Hypothalamus und im N. tractus solitarii (Young *et al.*, 1993)

Es wurden zahlreiche Untersuchungen zum Nachweis des  $\beta$ -Endorphins in peripheren Organen unternommen. Hier gilt zu berücksichtigen, daß für diese Untersuchungen Nachweisverfahren für  $\beta$ -Endorphin gewählt wurden, deren eingesetzte Antikörper gegen bestimmte Epitope innerhalb des  $\beta$ -Endorphins gerichtet waren, so daß  $\beta$ -Endorphin-Fragmente oder andersartige POMC-Spaltprodukte miterfaßt wurden. In diesem Fall sprechen wir von  $\beta$ -Endorphin immunreaktivem Material.  $\beta$ -Endorphin immunreaktives Material wurde



nachgewiesen: Im Nebennierenmark (*Evans et al., 1983*), in der Schilddrüse und der Lunge (*Clements et al., 1982*), im Gastrointestinaltrakt (*Sjanchez-Franco et al., 1981*), in der Plazenta (*Liotta and Krieger, 1980*), im Ovar (*Lim et al., 1983*) und in Zellen des Immunsystems (Übersicht zu finden bei Sibinga und Goldstein, 1988).

Im Blutplasma des Menschen findet man  $\beta$ -Endorphin immunoreaktives Material unter basalen Bedingungen in einer Konzentration von 2-4 fmol/ml (*Wiedemann and Teschemacher, 1986*).

Der  $\beta$ -Endorphin-Nachweis in der Haut ist für diese Arbeit von besonderem Interesse (*Slominski et al., 1993*)

### **1.3 Funktionelle Bedeutung des $\beta$ -Endorphins**

Die funktionelle Bedeutung des  $\beta$ -Endorphins muß von der Bindung an seine Rezeptoren abhängen. Interagiert der N-Terminus des Peptids mit dem Opioidrezeptor, sind Opioid-Wirkungen zu erwarten.

Nun vermag  $\beta$ -Endorphin auch über sein C-terminales Ende an Bindungsstellen zu binden. Im Fall dieser Non-Opioid-Bindung sind andere Wirkungen zu erwarten.

#### **1.3.1 Opioidbindungsstellen (Opioid-Rezeptoren) und Non-Opioid-Bindungsstellen des $\beta$ -Endorphins**

##### **1.3.1.1 Opioid-Bindungsstellen (Opioidrezeptoren)**

Der Nachweis und die Isolierung spezifischer Opioidrezeptoren war mit großen Schwierigkeiten verbunden. 1973 gelang endlich der Nachweis durch drei voneinander unabhängigen Forschergruppen (*Pert and Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973*). Die erste Klonierung dieser Rezeptoren (*Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992; Reisine and Bell, 1993; Uhl et al., 1994; Knapp et al., 1995*) erfolgte 1992.

Heute geht man von der Existenz drei verschiedener Opioid-Rezeptortypen aus, die nach den in den Untersuchungen eingesetzten Verbindungen benannt wurden

(Brownstein, 1993):  $\mu$ -(Morphine),  $\kappa$ - (Ketocyclazocine) und  $\delta$ -Rezeptoren (SKF,10047 oder N-allylnormetazocine). Der Nociceptin-Rezeptor (ORL1) wird aufgrund seiner strukturellen Homologie seit kurzem zur Gruppe der Opioid-Rezeptoren gezählt (Übersicht bei Alexander und Peters, 1998). Das Vorkommen von Opioidrezeptorsubtypen ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ,  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$ ) wird angenommen. Prinzipiell können die Opioidpeptide an jeden der verschiedenen Rezeptortypen binden. Sie binden aber mit unterschiedlichen Affinitäten.  $\beta$ -Endorphin besitzt eine gewisse Selektivität für den  $\mu$ -Rezeptor, Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin zeigen eine hohe Selektivität für  $\delta$ -Rezeptoren und die Dynorphine und Neoendorphine bevorzugen den  $\kappa$ -Rezeptor. Alle Rezeptortypen können an inhibitorische G-Proteine ( $G_i$ ) koppeln und inhibieren darüber die cAMP-Bildung über Hemmung der Adenylylcyclase, öffnen  $K^+$ -Kanäle oder schließen  $Ca^{2+}$ -Kanäle (Übersicht bei Childers, 1991; Knapp et al., 1995).

### 1.3.1.2 Non-Opioid-Bindungsstellen auf Zellen

$\beta$ -Endorphin besitzt die Fähigkeit, über seinen C-Terminus an Rezeptoren zu binden. Wir sprechen dann von einer Non-Opioid-Bindung. Diese Bindung kann im Gegensatz zur Opioidbindung nicht mit Naloxon gehemmt werden.

Über eine Non-Opioid-Bindung vermag  $\beta$ -Endorphin mit Immunzellen zu interagieren. Non-Opioid-Bindungsstellen für  $\beta$ -Endorphin wurden auf einigen Zellen des Immunsystems nachgewiesen: Auf humanen Lymphozyten (Hazum et al., 1979), auf EI-4 Thymuszellen und Milzzellen der Maus (Shahabi et al., 1990; Schweigerer et al., 1983), auf Monozyten und auf Glioblasten des Menschen (Westphal and Li, 1984).

1982 konnte die spezifische  $\beta$ -Endorphin-Non-Opioidbindung am terminalen Komplementkomplex C5b-9 nachgewiesen werden (Schweigerer et al., 1982). Sieben Jahre später identifizierten Hildebrand et al. das Glykoprotein Vitronektin als  $\beta$ -Endorphin-bindende Komponente im terminalen Komplementkomplex (Hildebrand et al., 1989).

### 1.3.1.3 Non-Opioid-Bindungsstellen auf Makromolekülen: Vitronectin

Vitronectin ist ein multifunktionelles  $\alpha$ 1-Glykoprotein, welches zur Familie der Adhäsivproteine gehört.

#### 1.3.1.3.1 Adhäsivproteine und Zelladhäsionsmoleküle

Zu den Adhäsivproteinen gehören neben Vitronectin u.a. Fibrinogen, Fibronectin und der von-Willebrand-Faktor. Diese Proteine haben innerhalb ihrer Struktur ein gemeinsames Minimalepitop, die sogenannte RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp). Diese Sequenz ermöglicht ihnen die Bindung an Zelladhäsionsmoleküle (CAM). CAM sind Rezeptoren der Zelloberfläche, die die Bindung von Zellen untereinander oder an die Extrazelluläre Matrix vermitteln. Sie dienen der Herstellung des statischen Zusammenhaltes von Geweben und Organen. Weiter sind sie in dynamische Prozesse wie Morphogenese, Wundheilung, Entzündungsreaktionen und Metastasierung integriert. Manche CAM dienen gleichzeitig als Signaltransduktionsrezeptor.

Die größte Gruppe innerhalb der CAM bilden die Integrine, die auf allen Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten zu finden sind. Sie bestehen aus einem heterodimeren transmembranären Proteinkomplex, der sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Einheit zusammensetzt. Diese lassen sich in weitere Untereinheiten untergliedern, heute kennt man 16  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Einheiten. Da nicht alle Kombinationen möglich sind, sind heute ca. 21 Integrine bekannt, die Spezifitätsunterschiede hinsichtlich der Bindung ihrer Liganden zeigen.

Es können meistens mehrere Liganden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig binden.

Integrine können in aktiver und inaktiver Form vorliegen. Durch Aktivierung der Zelle verändert sich die Konformation der extrazellulären Rezeptordomänen und erhöht die Affinität des Liganden zu seinem Rezeptor. Zu der Gruppe der Integrine gehören auch die Vitronectin-Rezeptoren. Es existieren vier Rezeptoren, an denen Vitronectin neben anderen Adhäsionsproteinen binden kann:  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_1$ . Von diesen sind  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  die im Zusammenhang mit Vitronectin am besten untersuchten Rezeptoren (*Cherish et al., 1989; Ramaswamy and Hemler, 1990;*

*Smith et al., 1990; McLean et al., 1990; Wayner et al., 1991*). Allerdings scheint nur  $\alpha_v\beta_3$  in die Förderung des Wachstums von Zellen involviert zu sein (*Wayner et al., 1991*)

#### 1.3.1.3.2 Nachweis des Vitronektins

Vitronectin ist ein multifunktionales  $\alpha 1$ -Glykoprotein, das u.a. im Blutplasma des Menschen und in der Extrazellulären Matrix von Geweben nachgewiesen wurde. Seine Multifunktionalität basiert auf einer Reihe funktionell unterschiedlicher Strukturdomänen, wodurch es sowohl in Zelladhäsionsvorgängen, dem Gerinnungs- und dem Immunsystem wirksam werden kann. Die Multifunktionalität des Proteins trug entscheidend dazu bei, daß Vitronectin mehrfach unter unterschiedlichen Namen in der Literatur beschrieben wurde. Erst 1985 wurde erkannt, daß es sich jeweils um dasselbe Protein handelte:

1967 konnte aus Humanserum ein  $\alpha 1$ -Glykoprotein durch Adsorption an Glas angereichert werden, welches die Anheftung und Ausbreitung von Zellen förderte (*Holmes, 1967*).

1980 wurde ein weiteres Protein aus Humanserum isoliert, welches das „spreading“ von Epi- und Endothelzellen förderte und deshalb als „serum spreading factor“ bezeichnet wurde (*Barnes et al., 1980*), 1975 identifizierten Kolb und Müller-Eberhard ein Bande-5-Protein oder später S-Protein genanntes Molekül als Komponente des hochmolekularen löslichen terminalen Komplementkomplexes (*Kolb and Müller-Eberhard, 1975*). Das Protein erhielt diesen Namen, da es die „membrane binding site“ des Komplementkomplexes besetzt, nicht zu verwechseln mit Protein S, dem Co-Faktor des Protein C im Gerinnungssystem. 1983 gelang die Identifizierung von Vitronectin durch den Einsatz monoklonaler Antikörper (*Barnes et al., 1983*) sowie die Isolierung des Proteins mittels Affinitätschromatographie (*Hayman et al., 1983*).

Die Charakterisierungen der Aminosäuresequenz des Vitronektins (*Suzuki et al., 1985*) und der des S-Proteins (*Jenne and Stanley, 1985*) konnte durch Übereinstimmung der Ergebnisse den Beweis erbringen, daß es sich um das gleiche Protein handelt. Der Vergleich der immunologischen und funktionellen Eigenschaften

beider Proteine bestätigten diesen Befund (*Preissner et al.*, 1986; *Tomasini and Mosher*, 1986).

Epibolin, ein von Stenn 1981 beschriebenes Plasmaprotein, welches die Ausbreitung von Epithelzellen stimuliert, ist ebenfalls identisch mit Vitronektin (*Stenn*, 1981).

(Übersichten zur Geschichte, Struktur und Funktion des Vitronektins bei *Preissner*, 1988 und *Wöhner*, 1998)

### 1.3.1.3.3 Struktur des Vitronektins

Humanes Vitronektin ist ein saures  $\alpha$ 1-Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von ca. 11% (*Kitagahi-Ogawa et al.*, 1980) und einem Molekulargewicht von 75 000 Da. Im menschlichen Blutkreislauf zirkuliert es in einkettiger (MG: 75 KDa) und unter reduzierenden Bedingungen in zweikettiger Form (MG: 65 KDa und 10 KDa). Im unreduzierten, einkettigen Zustand sind beide Ketten durch eine Sulfidbrücke miteinander verbunden. Die für die Spaltung verantwortliche(n) Protease(n) konnte(n) bisher nicht identifiziert werden. Das Vitronektin-Molekül umfaßt 459 Aminosäuren (*Suzuki et al.*, 1985; *Jenne and Stanley*, 1985).

Die Struktur des Vitronektins setzt sich wie folgt zusammen:

- **Der N-Terminus**

Der N-Terminus ist identisch mit Somatomedin B und wird deshalb auch Somatomedin-B-Domäne genannt. Somatomedin-B konnte in verschiedenen biologisch aktiven Isoformen im menschlichen Blut nachgewiesen werden. Es scheint als unabhängiger Plasmfaktor zu existieren und entsteht durch Abspaltung vom Vitronektin-Molekül.

Die Somatomedin-B-Domäne stellt eine hochaffine Bindungsdomäne für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) dar.

- **Verbindungssegment mit RGD-Sequenz**

Das Verbindungssegment enthält eine Zelladhäsionsdomäne, die typisch ist für Zelladhäsionsmoleküle und ihnen ihre zelladhärierenden Eigenschaften verleiht (*Preissner*, 1988). Die sogenannte RGD-Sequenz setzt sich aus den drei

Aminosäuren Arg-Gly-Asp zusammen. Diese drei Aminosäuren sind essentiell für die Bindung an Integrine, über die Vitronektin Adhäsion und Wachstum von Zellen vermittelt.

Des Weiteren befindet sich in diesem Verbindungssegment u.a. eine saure Region („Acidic region“) und eine Kollagen-Bindungsdomäne. Die „Acidic region“ scheint eine Rolle im initialen Vitronektin-Bindungsprozeß an Thrombinkomplexe zu spielen (*de Boer et al., 1992*).

- **Hämopexinartige Domänen**

Diese sich dem Verbindungssegment anschließende bis zum C-Terminus reichende Domäne ähnelt in ihrem Aufbau dem Hämopexin.

Hämopexin ist ein Häm-bindendes Plasmaprotein, welches aus zwei symmetrischen Domänen, verbunden über eine „Scharnier“-Region, besteht. Jede Domäne setzt sich aus je vier homologen Abschnitten („repeats“) zusammen.

Im Vitronektinmolekül folgen dem Verbindungssegment sieben Hämopexin-ähnliche „repeats“ (*Jenne and Stanley, 1987*). Auf den ersten „repeats“ konnten in Abhängigkeit von der Konformation des Proteins zwei aneinandergrenzende heparinbindende Regionen identifiziert werden (*Liang et al., 1997*). Einige hydrophobe Wiederholungssequenzen wurden als spezifische Bindungsstellen für Streptokokken der Gruppe A identifiziert (*Liang et al., 1997*).

#### **Heparin-Bindungsstelle**

Die zweite Hämopexinartige Domäne enthält einen hohen Anteil basischer Aminosäurenreste (Arg und Lys) und repräsentiert die eigentliche Heparin-Bindungsstelle, die aus zwei übereinstimmenden Sequenzen aufgebaut ist (*Cardin and Weintraub, 1989*). Diese Domäne verleiht Vitronektin die Fähigkeit, an Heparin und andere Glykosaminoglykane zu binden. Darüber hinaus vermittelt sie die Bindung an Kollagen (Typ1), Osteonektin, PAI-1 und Plasminogen (*Chain et al., 1991; Kost et al., 1992; Rosenblatt et al., 1997*).

#### **Potentielle Phosphorylierungsstelle**

Angrenzend an diese basische Domäne folgt der Ort für die cAMP abhängige Phosphorylierung durch Proteinkinase A (*Gechtman et al., 1997*). In dieser Region wird auch eine mögliche Bindungsstelle für den Urokinase/Urokinase-Rezeptor-Komplex vermutet (*Waltz et al., 1997*).

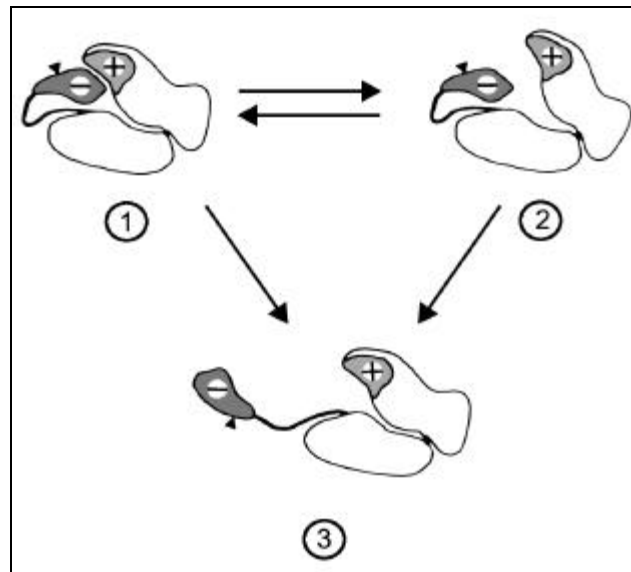
- **C-Terminus**

Eine wichtige funktionelle Bedeutung besitzt die Tertiärstruktur des Proteins. Vitronektin ändert unter bestimmter Manipulation seine sterische Form; diese Fähigkeit scheint u.a. für die Multifunktionalität des Vitronektins verantwortlich zu sein. Die vorherrschende Gestalt des im Plasma vorkommenden Vitronektins ist die ineinandergefaltete Form (1), in dieser Arbeit auch als „native“ Form bezeichnet. So zusammengefoldet, ist die Mehrzahl der Liganden-Bindungsstellen verdeckt und sie werden erst durch Manipulation des Proteins zugänglich.

Die Stabilität des Moleküls ist durch die gegensätzlichen Ladungen des N- und C-Terminus gegeben.

Die Freilegung der  $\beta$ -Endorphin-Bindungsstelle in den mittleren Abschnitten des Proteins erfolgt durch Inkubation von Vitronektin mit Heparin in hohen Konzentrationen, durch Integration in den terminalen Komplementkomplex oder durch Assoziation an Oberflächen (2).

Komplexbindung mit PAI-1, mit dem Thrombin-Antithrombin-Komplex, mit Komplement C5b-9 und Denaturierung des Proteins führen zu einer vollständigen Entfaltung des Vitronektin-Moleküls (3), welches die Heparin-Bindungsfähigkeit steigert. Das Protein in der entfalteten Form neigt stark zur Bildung von Multimeren.



**Abb.3** Hypothetisches Modell der Übergänge verschiedener Konformationen des Glykoproteins Vitronektin (nach Preissner et al., 1998).

Das native Vitronektin liegt im Plasma in einer ineinandergefalteten Form (1) vor.

Durch Inkubation mit Heparin in hohen Konzentrationen, Integration in den terminalen Komplement-Komplex oder Assoziation an Oberflächen wird das Molekül partiell aufgefaltet (2).

Demgegenüber führt die Denaturierung des Vitronektin-Moleküls zur Entstehung einer weiteren, vollständig gestreckten Form (3), die zur Bildung von Multimeren neigt.

#### 1.3.1.3.4 Vorkommen und Funktion

Der Hauptsyntheseort des Vitronektins ist, wie für die meisten zirkulierenden Plasmaproteine, die Leber. Diese Annahme wird durch einen deutlichen Abfall der Vitronektinkonzentration im Plasma bei Patienten mit Leberzirrhose bestätigt. Die Konzentrationsabnahme des Vitronektins korreliert eng mit der anderer Lebersyntheseprodukte (*Kemkes-Matthes et al., 1987*). Als weitere mögliche Synthesorte werden Fibroblasten (*Hayman et al., 1983*) und Endothelzellen (*Preissner et al., 1988*) angenommen. Die mittlere Konzentration des Vitronektins im Plasma des Menschen beträgt ca. 0,35 mg/ml (*Preissner et al., 1985; Colan et al., 1988*).



Neben dem Blutplasma konnte Vitronektin nachgewiesen werden in: Sperma (*Bronson and Preissner, 1997*), Urin, Amnionflüssigkeit, Liquor und in bronchoalveolärer Lavage (*Preissner et al., 1998*). Besonders bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen wurden bis zu zehnfach erhöhte Vitronektinspiegel gemessen (*Pohl et al., 1991*).

Des weiteren wurden Vitronektinablagerungen in zahlreichen Geweben des Menschen nachgewiesen, u.a. der Gefäßwand (Übersicht bei Seiffert, 1997). Auch in der menschlichen Haut wurde das Glykoprotein nachgewiesen (*Dahlbäck et al., 1986*).

Vitronektin scheint neben Lungenerkrankungen in weitere pathogene Prozesse involviert zu sein. Es wurden Ablagerungen in sklerotischen oder nekrotischen Geweben, wie z.B. fokal nekrotisierender Hepatitis, degenerativen Hauterkrankungen, akutem Myokard- und Niereninfarkt und bei Patienten mit degenerativen Erkrankungen des ZNS gefunden. Ebenso zu finden sind Vitronektin-Ablagerungen in den intimalen Plaques bei Arteriosklerose (*Niculescu et al., 1987; Guettier et al., 1989*).

Auf die Funktion des Glykoproteins wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen:

- **Interaktion mit Heparin**

Vitronektin neutralisiert die antikoagulatorische Aktivität von Heparin durch direkte Bindung an das Protein. Diese Wirkung des Proteins wird sowohl für Standardheparin wie auch für niedermolekulares Heparin beobachtet (*Preissner and Müller-Berghaus, 1987*). Unter „normalen“ Bedingungen sind nur 20% der Heparin-Bindungsstellen auf Vitronektin zugänglich (*Akama et al., 1986*). Wechselwirkungen mit Heparin selbst oder Adhäsion auf Oberflächen sowie Komplexbildung mit Faktoren des Komplementsystems erhöhen die Anzahl von Heparin-Bindungsstellen um ein Vielfaches.

Die Neutralisierung der Heparinwirkung ist nicht nur durch das einfache, sondern auch durch das komplexgebundene Vitronektin möglich.

Vitronektin scheint u.a. über diesen Prozeß kontrollierend in Abläufe des Gerinnungssystems einzugreifen.

- **Bildung von ternären und binären Komplexen**

Vitronektin ist in der Lage mit Thrombin und Antithrombin III einen ternären Komplex (*Preissner et al., 1987*) zu bilden. Untersuchungen, in denen die Bindung von Thrombin-Antithrombin III-Komplexen an immobilisiertes Vitronektin beschrieben wird (*Ill and Rouslathti, 1985*) oder der Nachweis der Kopräzipitation in der Immunoelktrophorese (*Jenne et al., 1985; Preissner et al., 1987*) belegen diese Aussage. Der für die Inhibierung des Gerinnungssystems verantwortliche Thrombin-Antithrombin III-Komplex scheint somit in der Zirkulation immer als ternärer Komplex mit Vitronektin zu existieren. Ebenso scheint der ternäre Komplex durch die Zellbindungsdomäne im Vitronektin effektiver mit Zelloberflächen reagieren zu können, so daß es zu einer schnelleren Entfernung dieser Komplexe aus der Zirkulation kommen kann. Dieser Effekt konnte im Tierversuch nachgewiesen werden (*Shifman and Pizzo, 1982*). Eventuell könnte dieser Komplex auch zu einer erhöhten Zelladhäsion und zum Einsprossen der Zellen an Verletzungsstellen, z.B. der Gefäßwand, führen und so die Heilung positiv beeinflussen (*Preissner et al., 1988*).

Vitronektin besitzt die Fähigkeit an Urokinaserezeptoren zu binden, dadurch zelluläre Kontakte zu vermitteln und durch Kooperation mit Integrinen oder anderen Bestandteilen auf Zelloberflächen in die Signaltransduktion einzugreifen. Dieser Rezeptor wurde in Gefäßen, Blut- und Tumorzellen nachgewiesen und wirkt nach Aktivierung modulierend auf Adhäsionsprozesse, Zellinvasion, und Proteolyse in unmittelbarer Zellnähe (*Preissner et al., 1998*). Die Vitronektin-Bindung wird durch die Anwesenheit von Urokinase oder Urokinase-Isoformen verstärkt. Vitronektin/Urokinase/Urokinase-Rezeptorkomplexe vermögen auch auf Zellen zu binden, die keinen Urokinase-Rezeptor exprimieren (*Higazi et al., 1996*), da an Zelloberflächen-gebundenes Vitronektin lösliche Urokinase/Urokinase-Rezeptorkomplexe binden kann. Diese ternären Komplexe wurden u.a. bei Brustkrebs im Gewebe nachgewiesen (*Carriero et al., 1997*). Des weiteren können Proteaseinhibitoren, wie z.B. Proteaseinhibitoren der SERPIN-Familie, PAI-1, durch die Bindung an Vitronektin in der Extrazellulären Matrix fixiert und in ihrer Wirkung stabilisiert werden (*De Clerk et al., 1988*). PAI-1 blockiert die Vitronektin-Bindung am Urokinase-Rezeptor und bildet mit dem Glykoprotein selbst binäre Komplexe. Ebenso blockiert es die Vitronektin-Bindung

an Integrine und hemmt auf diesem Weg die Vitronektin-abhängige Zelladhäsion und -migration (*Preissner et al., 1998*).

- **Akut-Phase-Protein**

Es konnten Anstiege der Vitronektinkonzentration im Plasma bei Patienten nach orthopädischen Operationen und bei Nagetieren nach Stimulation mit Endotoxin, Tumor-Nekrose Faktor- $\alpha$  und Interleukin-6 gemessen werden (*Seiffert et al., 1995*). Aufgrund dieser Daten wird vermutet, daß Vitronektin zu der Familie der Akut-Phase-Proteine gehören könnte.

- **Immunsystem**

Im Immunsystem kontrolliert Vitronektin u.a. den terminalen Lysekomplex, es beschränkt den Angriff des lytischen Komplexes auf Zielzellen und schützt körpereigene Zellen.

Dabei bildet Vitronektin mit Vorläuferkomplexen dieser lytischen Phase einen löslichen SC5b-7-Komplex (*Podack et al., 1978*), der nicht mehr an Membranen binden kann. Zusätzlich unterdrückt Vitronektin die C9-Polymerisation bei der Bildung des lytischen Komplexes. Die entstandenen inaktiven, löslichen SC5b-9-Komplexe, die nicht mehr die tubuläre Struktur der Poly-9-Pore aufweisen (*Podack et al., 1984*), verhindern die Bildung der Zellmembranintegrität zerstörenden Pore.

Die Wirkung als Komplementinhibitor ist sowohl der fluiden Form wie auch der membranassoziierten Form zueigen und wird über die Heparin-Bindungsdomäne vermittelt.

Der gC1q-Rezeptor für Vitronektin-Multimere, der auf Zelloberflächen lokalisiert ist, scheint in Prozesse der Phagozytose involviert zu sein. Ebenso scheint Vitronektin über diesen Rezeptor als beitragende Komponente bei Apoptosis (*Savill et al., 1990*) wirksam zu werden.

Des weiteren besitzt Vitronektin die Fähigkeit spezifisch an Bakterien, wie Streptokokken der Gruppen A, C und G, Staphylokokkus aureus und E. coli, zu binden und u.a. die Adhäsion von Streptokokken an Endothelzellen zu fördern (*Chhatwal et al., 1987; Liang et al., 1993*).

- **Adhäsivprotein:**

Wie schon erwähnt kann Vitronectin über seine RGD-Sequenz an Integrine binden. Die Integrine  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_1$  sind nachgewiesene Rezeptoren für Vitronectin und wurden u.a. auf Endothelzellen, Thrombozyten, Osteoklasten, Makrophagen, Melanomzellen und Osteosarkomzellen gefunden [Übersicht bei Preissner (1991) und Tomasini and Mosher (1991)]. Adhäsivproteine scheinen in viele Abwehrprozesse des Organismus involviert zu sein. Zu diesen gehören u.a.: Die Wundheilung, die humorale und zelluläre Immunabwehr und das Gerinnungssystem. Tritt ein Adhäsivprotein in Kontakt mit seinem Rezeptor, führt dies zu einer Umorientierung des Zytoskeletts. Ein solcher Vorgang ist die Unterstützung der Anheftung und Aggregation von Thrombozyten an verletzte Gefäßwände durch Interaktion mit Fibrinogen. Vitronectin scheint in diesen Prozeß ebenfalls involviert sein (*Marguerie et al., 1982*). Eine besondere Stärke des Vitronectins, ebenfalls als „Spreading factor“ beschrieben (siehe 1.3.1.3.2), ist die Förderung der Adhäsion und Migration von kultivierten Zellen an Oberflächen. Versuche mit kultivierten humanen Endothelzellen zeigten, daß die Anheftung und Ausbreitung an mit Vitronectin beschichtete Oberflächen schon mit Konzentrationen des Adhäsivproteins erreicht wird, die einem 1/100 bis 1/1000 seiner Plasmakonzentration entsprechen (*Preissner et al., 1988*). Der Prozeß der Endothelzellanheftung und -migration kann neben dem einfachen auch von dem komplexgebundenem Vitronectin vermittelt werden. Spezifische Vitronectin-Bindungsstellen auf Endothelzellen konnten nachgewiesen werden. Der Prozeß der Anheftung des Vitronectins an Endothelzellen ist durch den Einsatz spezifischer Vitronectin-Antikörper blockierbar. In der Zellkultur scheint Vitronectin ein wichtiger Adhäsionsfaktor für das Zellwachstum zu sein. Es wird den meisten Kulturmedien als Bestandteil des fetalen Kälberserums (FCS) zugesetzt (*Hayman et al., 1985*).

#### 1.3.1.3.5 Interaktion mit $\beta$ -Endorphin

Anfang der 80iger Jahre konnte die Bindung von  $\beta$ -Endorphin an den löslichen terminalen Komplement SC5b-9-Komplex, über den C-Terminus des Peptids, nachgewiesen werden (*Schweigerer et al., 1982*). Sieben Jahre später wurde

Vitronectin als verantwortliche Komponente dieses Komplexes für die  $\beta$ -Endorphin-Bindung identifiziert (*Hildebrand et al., 1989*). Die  $\beta$ -Endorphin-Bindung an Vitronectin erfolgt am mittleren Molekülabschnitt des Proteins. Der N-Terminus des  $\beta$ -Endorphin bindenden Fragmentes befindet sich innerhalb des für die Zelladhäsion verantwortlichen RGD-Epitops (Position 45-47), während der C-Terminus zwischen den Aminosäuren 340 und 380 in den stark basischen Regionen der Heparin-Bindungsdomäne auf der zweiten Hämoexinartigen Domäne zu finden ist (*Wöhner, 1998*).

Da die  $\beta$ -Endorphin-Bindung im mittleren Teil des Vitronectin-Moleküls erfolgt, ist die Bindung unabhängig von der proteolytischen Spaltung des Proteins. Es vermag sowohl an die 75-kDa wie auch an die 65-kDa schwere Form des Vitronectins zu binden.

Mit dem Nachweis der  $\beta$ -Endorphin-Bindung an Vitronectin wurde eine weitere periphere Bindungsstelle des Opioidpeptids gefunden.

$\beta$ -Endorphin ist kaum in der Lage an „natives“ Vitronectin im Plasma zu binden. Nach Kontakt des Proteins mit denaturierenden Substanzen, nach Inkubation mit Heparin und vor allem nach Assoziation an Oberflächen werden die  $\beta$ -Endorphin-Bindungsstellen ihrem Liganden zugänglich. Über die Non-Opioidbindung an Vitronectin, kann  $\beta$ -Endorphin an den C5b-9-Komplex des Komplementsystems binden (*Schweigerer et al., 1982*).

In Anbetracht der Tatsache, daß Vitronectin u.a. in Wundheilung und entzündliche Prozesse involviert ist und  $\beta$ -Endorphin mit dem Immunsystem interagiert, könnte die Interaktion des Opioidpeptids mit dem Glykoprotein eine funktionelle Bedeutung in Wundheilungsprozessen haben (s. 6.2.4 ).

### **1.3.2 Mögliche Funktionen des $\beta$ -Endorphins im ZNS**

Über Bindung an Opioid-Rezeptoren entfaltet  $\beta$ -Endorphin besondere Wirkungen im ZNS in Bezug auf die Schmerzverarbeitung.  $\beta$ -Endorphin(1-31) ist eine der am stärksten analgetisch wirksamen natürlichen Substanzen (*Bradbury et al., 1976; Loh et al., 1976; Van Ree et al., 1976; Oyama et al., 1980*).

Im Tierversuch konnten neben Analgesie (*Loh et al., 1976*), bei intravenöser oder intrathekalen Gabe Blutdrucksenkung und Dämpfung von Atem- und Herzfrequenz

(*Malcolm and Holaday, 1985; Tsunoda et al., 1993*) und eine antitussive Wirkung (*Kamei et al., 1993*) nachgewiesen werden. Des weiteren nimmt  $\beta$ -Endorphin, bei Verabreichung am Tier, Einfluß auf die Aufnahme und Verwertung von Nährstoffen, auf die Thermoregulation, auf endokrine und neuroendokrine Steuermechanismen, auf die Steuerung von Verhaltensmustern, auf intellektuelle Leistungen und immunregulatorische Funktionen (*Teschemacher, 1987*).

Einen besonderen Platz scheint  $\beta$ -Endorphin in für den Organismus bedrohlichen Situationen einzunehmen. „Streß“, sowohl in psychischer wie auch in körperlicher Hinsicht, führt zu einer vermehrten Freisetzung von CRH und Katecholaminen und ebenfalls zu einer vermehrten Expression von POMC und zur Freisetzung seiner Spaltprodukte, z.B.  $\beta$ -Endorphin und ACTH (*Young et al., 1993*).  $\beta$ -Endorphin scheint Teil eines zentralen „Streß-beantwortenden Systems“ zu sein.

Untersuchungen zum „Streß der heutigen Zeit“ stützen diese Daten. Nach extremer körperlicher Belastung, wie z.B. beim Marathonlauf (*Heitkamp et al., 1993*) und Bungee-Jumping (*Hennig et al., 1994*) wurden erhöhte Spiegel von  $\beta$ -Endorphin-immunoreaktivem Material im Plasma bestimmt. Ebenfalls erhöhte Spiegel ließen sich bei einer Vielzahl von Erkrankungen und pathologischen Situationen nachweisen: U.a. bei chirurgischen Eingriffen (*Cohen et al., 1984*), nach Akupunktur (*Kho et al., 1993*), während der Schwangerschaft und unter der Geburt (*Csontos et al., 1979*), bei endogener Depression (*Goodwin et al., 1993*), bei Neigung zu vasodepressorischen Synkopen (*Wallbridge et al., 1994*) oder nach einem Status epilepticus (*Calabrese et al., 1993*).

Mit einer vermehrten Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin und anderen Opioidpeptiden im ZNS können möglicherweise Reizantworten, wie der Schmerz-Flucht-Reflex, Dysphorie, Husten, Niesen, Erbrechen, Hungerreaktion, Tachypnoe, Miktion und Defäkation wirkungsvoll gehemmt werden, die unter Normalbedingungen zum Erhalt der Homöostase dienen, aber unter extremen Belastungssituationen, wie z.B. bei Flucht vor dem „Freßfeind“, unterdrückt werden müssen. Opioide könnten somit zum Erhalt der Handlungsfähigkeit in diesen lebensbedrohlichen Situationen beitragen.

### 1.3.3 Mögliche Funktionen des $\beta$ -Endorphins in peripheren Organen

Über die Wirkung des  $\beta$ -Endorphins in der Peripherie ist bisher wenig bekannt. Im Blutplasma unter Streß nachgewiesene erhöhte Konzentrationen von  $\beta$ -Endorphin lassen auf eine Bedeutung außerhalb des ZNS schließen.

Es wurden zahlreiche Versuche zur Aufklärung der  $\beta$ -Endorphin-Funktion in der Peripherie unternommen, bisher ohne großen Erfolg.

Einige Ergebnisse erhielt man jedoch bei Untersuchungen der Interaktion des  $\beta$ -Endorphins mit Zellen des Immunsystems.

Bei Interaktion via Opioidrezeptoren mit Granulozyten steigert es deren Chemotaxis (*Van Epps and Saland, 1984; Marcoli et al., 1989*) und ihre Fähigkeit, an Serum-beschichtetem Glas zu adhären (*Van Epps and Kutvirt, 1987*).

Des weiteren regt  $\beta$ -Endorphin über Bindung an Opioidrezeptoren die Interleukin 2- (IL2-) Produktion von Concanvalin A- (ConA-) stimulierten Lymphozyten an (*Gilmore and Weiner, 1988*).

Über die Bindung an Non-Opioid-Bindungsstellen konnten folgende Effekte nachgewiesen werden: Steigerung der Proliferation und Interleukin-2- (IL-2-) Produktion in Maussplenozyten (*Gilmore and Weiner, 1988*) und in peripheren einkernigen Blutzellen in Reaktion auf Lektin (*Mc Cain et al., 1982; Puppo et al., 1985*). In Thymozyten der Ratte wird die Calcium-Aufnahme in die Zelle in Anwesenheit von  $\beta$ -Endorphin gesteigert (*Hemmick and Bidlack, 1987*).

Die Steigerung der Chemotaxis von Monozyten scheint sowohl über Opioid-, wie Non-Opioid-Bindung zu erfolgen (*Sacerdote and Panerai, 1988*).

Des weiteren führt die Anwesenheit von  $\beta$ -Endorphin zu einer vermehrten Bildung zytotoxischer T-Lymphozyten (*Carr et al., 1986*) und hemmt die Rosetten-Bildung von T-Lymphozyten (*Wybran et al., 1979*).

Außerdem supprimiert es die Interferon- $\gamma$ - (INF- $\gamma$ -) Produktion peripherer einkerniger Blutzellen (*Peterson et al., 1987*), steigert die Aktivität natürlicher Killerzellen (*Mandler et al., 1986*) und die Antikörperproduktion in B-Lymphozyten (*Johnson et al., 1982*).

In Neutrophilen und Makrophagen konnte eine Steigerung der Produktion von Superoxiden (*Sharp et al., 1985*) gezeigt werden.

In vitro Versuche konnten eine Steigerung der POMC-Gen-Expression in Zellen der Hypophyse durch Interleukin1 (IL1) nachweisen (*Dinarello, 1988; Oppenheim et al., 1988*).

Eine Übersicht zur Interaktion von Opioidpeptiden mit Immunzellen ist zu finden bei Sibinga und Goldstein (1988).

Diese Daten wecken die Vermutung, daß eine Beziehung zwischen den Funktionen des Immunsystems und der Freisetzung von POMC-Spaltprodukten, besonders des  $\beta$ -Endorphins, existieren könnte (*Teschemacher et al., 1990*).

#### **1.3.4 Mögliche Funktionen des $\beta$ -Endorphins in der Haut**

Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind Bemühungen, das Prinzip der Streßadaptation auf die Haut zu übertragen.

Die Haut ist das Organ, welches dem größten Einfluß der Umwelt ausgesetzt ist. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist der Schutz des Organismus vor extremen Temperaturen, Traumata, biologischen und chemischen Schadstoffen und Strahlung. Es ist sehr wahrscheinlich, daß POMC-Spaltprodukte, darunter auch das  $\beta$ -Endorphin, dazu beitragen, diese Funktion zu erfüllen. Die folgenden Untersuchungen stützen diese Hypothese: Es wurden Hautzellen Stressoren wie UV-Licht, IL-1 $\alpha$  und TPA (phobol 12-tetradecanoate 13-acetate) ausgesetzt, was in einigen Versuchen zu einem Anstieg der Konzentrationen von  $\beta$ -LPH und  $\beta$ -Endorphin in den Zellen geführt haben soll (*Wintzen et al., 1996*). Dieser Prozeß scheint allerdings von bestimmten nutritiven Bedingungen abhängig zu sein (*Wintzen et al., 2000*). Ebenso wurde ein Anstieg des  $\beta$ -Endorphin-Spiegels im Blut eines Probanden von ca. 30% nach großflächiger UV-Bestrahlung beschrieben (*Levins et al., 1983; Sharp et al., 1985*).

In Untersuchungen an Patienten, die unter Hauterkrankungen wie Psoriasis, Neurodermitis und Sklerodermie litten, wurden leicht erhöhte  $\beta$ -Endorphin-Spiegel im Blutplasma nachgewiesen (*Glinski et al., 1993*).

Seit langem wird ein Zusammenspiel des Immunsystems mit der Haut, insbesondere der Epidermis, vermutet. In Studien konnten eine Produktion von Thymopoietin (*Chu et al., 1983*), einem aus Thymus isolierten Mediator der T-Lymphozytendifferenzierung sowie die Produktion zahlreicher Cytokine der



Interleukin-Familie (*Larsson et al., 1980; Luger et al., 1981; Sauder et al., 1982; Kupper et al., 1986*) nachgewiesen werden. Das Immunabwehrsystem der Haut kann in einwanderndes, zirkulierendes und ortsständiges System unterteilt werden. Keratinozyten, Fibroblasten, vaskuläre und lymphatische Endothelien, Mastzellen, Histiozyten, T-Lymphozyten und dendritische Zellen bilden die ortsständige, immer präsente Immunabwehr der Haut. Das einwandernde System setzt sich zusammen aus Monozyten, basophilen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen und B- und T-Lymphozyten. Dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und T-Lymphozyten bilden das zirkulierende System.

$\beta$ -Endorphin vermag mit einigen dieser Zellen zu interagieren, ein möglicher Einfluß in Prozesse der Immunabwehr in der Haut ist deshalb nicht unwahrscheinlich.

Über die Funktion des  $\beta$ -Endorphins in der Haut wissen wir bisher wenig. Über den 1998 entdeckten  $\mu$ -Rezeptor scheint  $\beta$ -Endorphin in den Krankheitsprozeß der Psoriasis involviert zu sein (*Bigliardi et al., 2000*). Es konnten eine vermehrte Cytokeratin 16-Expression, ein Marker für Hyperproliferation und Veränderungen der Haut sowie eine Downregulation des  $\mu$ -Rezeptors beobachtet werden. 1994 waren bereits erhöhte  $\beta$ -Endorphin-Spiegel bei Psoriasis-Patienten nachgewiesen worden (*Glinski et al., 1994*).

#### **1.3.4.1 Nachweis von $\beta$ -Endorphin und POMC-Fragmenten in der Haut**

Besonderes Interesse gilt der Haut als Bestandteil eines neuroendokrinen Systems in Bezug auf Streß. POMC-Gen-Expression konnte in Hautzellen in Zellkulturen von Keratinozyten, Melanozyten, dermalen Fibroblasten, Endothelien, Langerhans-Zellen, Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und Leukozyten nachgewiesen werden (*Slominski et al., 2000; Slominski et al., 1993; Luger et al., 1999; Luger et al., 1998; Paus et al., 1999*). Die POMC mRNA der Hypophyse ist 1,1 kb lang (*Autelitano et al., 1989*).

In der Haut wurde eine POMC mRNA nachgewiesen, die in ihrer Länge der in der Hypophyse gebildeten entsprach (*Schauer et al., 1994*). Des weiteren werden aber auch längere und kürzere POMC mRNA-Moleküle beschrieben. Die Existenz von POMC-Peptiden, wie ACTH,  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH und  $\beta$ -Endorphin, wurde in normalen

und pathogenen Melanozyten, Keratinozyten, Langerhans-Zellen und einkernigen dermalen Entzündungszellen des Menschen beschrieben (*Slominski et al., 2000; Luger et al., 1999; Slominski et al., 1993; Nagahama et al., 1998*).

Wird nun die gesamte Haut, als größtes Organ des menschlichen Körpers, mit UV-Licht bestrahlt, kommt es tatsächlich zu einem Anstieg des  $\beta$ -Endorphin-Spiegels im Serum um ca. 30 % (*Levins et al., 1983; Sharp et al., 1985*). Welche funktionelle Bedeutung das hat, ist unklar (*Greiter et al., 1986*).

Zur Untersuchung der Streßadaptation der Haut wurde bevorzugt UV-Strahlung (100-400 nm) verwendet. Es konnte eine UV-induzierte POMC-Gen-Expression in der Haut, in normalen und malignen Keratinozyten und Melanozyten in Zellkultur nachgewiesen werden (*Slominski et al., 2000; Slominski and Pawelek, 1998; Luger et al., 1998; Scholzen et al., 1999; Chakraborty et al., 1999*).

Keratinozyten sind darüber hinaus scheinbar in der Lage eine Vielzahl von Cytokinen, wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Makrophagen-Inhibitor-Faktor (MIF), Eikasanoide, basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), IGF-I, transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- $\alpha$ ) und Endothelin zu produzieren und freizusetzen (*Bos, 1998; Luger et al., 1999; Scholzen et al., 1999; Streilein et al., 1997; Duthie et al., 1999; Kondo, 1999; Köck et al., 1990; Grewe et al., 1995; Skov et al., 1998; Shimizu et al., 1999; Werth and Zhang, 1999; Scholzen et al., 1998*).

IL-1 scheint die POMC-Gen-Expression und die POMC-Peptid-Produktion in normalen und malignen Keratinozyten und Melanozyten, dermalen Endothelzellen und circulierenden Makrophagen zu induzieren und zu stimulieren (*Slominski et al., 2000; Luger et al., 1999; Luger et al., 1998; Scholzen et al., 1999; Wintzen et al., 1996*).

#### **1.3.4.2 Nachweis von $\beta$ -Endorphin-Bindungsstellen in der Haut**

Die in der Haut ansässigen Immunzellen exprimieren Rezeptoren für Neurotransmitter und Neuropeptide. Auch auf Keratinozyten und Melanozyten konnten einige dieser Rezeptoren nachgewiesen werden.

Interesse galt besonders einer möglichen Bindungsstelle für Opioidpeptide, insbesondere  $\beta$ -Endorphin, auf Keratinozyten. Tatsächlich gelang es einer Arbeitsgruppe 1998 einen Opioidrezeptor auf Keratinozyten nachzuweisen. Dieser  $\mu$ -Rezeptor wurde sowohl auf mRNA-, wie auch auf Protein-Ebene nachgewiesen und scheint vor allem in der suprabasalen Schicht der Epidermis lokalisiert zu sein (*Bigliardi et al., 1998*). Zusätzlich wurde der Rezeptor auf Keratinozyten der äußeren Wurzelschicht von Haarfollikel, in peripheren Epithelialzellen in Talgdrüsen und in sekretorischen Komponenten von Schweißdrüsen gefunden.

Ein assoziierter  $\xi$ -Rezeptor wurde in epithelialen Keratinozyten des Menschen und von Mäusen entdeckt (*Zagon et al., 1996*). Dieser Rezeptor bindet mit hoher Affinität Enkephaline. Diese scheinen eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten zu besitzen (*Zagon et al., 1996; Nissen and Kragballe, 1997*). Weitere Funktionen dieser Rezeptoren, sowie die Existenz weiterer Bindungsstellen für Opioidpeptide, sind zur Zeit Gegenstand der Forschung.

#### **1.3.4.3 Nachweis und Bedeutung von Vitronektin in der Haut**

Schon in den 70er Jahren wurde Vitronektin, damals unter dem Namen Epibolin, eine wichtige Funktion in Bezug auf das „Spreading“ von Hautzellen zugesprochen (*Stenn, 1978/79*).

Zellanheftung und –ausbreitung von humanen Endothelzellen auf mit Vitronektin beschichteten Oberflächen konnte schon bei Vitronektinkonzentrationen, die 1/100 bis 1/1000 der normalen Plasmakonzentration entsprachen, gezeigt werden (*Preissner et al., 1988*). Vitronektin kann über seine RGD-Sequenz mit Zellen interagieren oder über die Heparin-Bindungs-Domäne mit Zelloberflächen in Kontakt treten.

Vitronektin fördert das „Spreading“ und die lokale Motilität der Keratinozyten. Diese Prozesse lassen sich durch den Einsatz von spezifischen Vitronektin-Antikörpern blockieren (*Brown et al., 1991*).

In der Zellkultur scheint Vitronektin der wichtigste Adhäsionsfaktor zu sein, die zelladhäsionsvermittelnden Eigenschaften des Kulturmediums konnten hauptsächlich auf Vitronektin zurückgeführt werden (*Barnes et al., 1980*). Die direkte Interaktion des Vitronektins mit Endothelzellen konnte durch die Demonstration einer

spezifischen Bindung des Glykoproteins an Endothelzellen nachgewiesen werden (*Preissner et al., 1988*).

Vitronektin existiert sowohl im Plasma als auch in der Extrazellulären Matrix verschiedenster Gewebe, zu denen u.a. die embryonale Lunge, fetale Membranen, Skelettmuskulatur, Haut- und Nierengewebe des Menschen gehören (*Hayman et al., 1983*). Des weiteren konnte eine erhöhte Anzahl von Vitronektinablagerungen in erkrankter Haut, bei Lupus erythematodes und Dermatitis herpetiformis festgestellt werden (*Dahlbäck et al., 1989*). Vitronektinablagerungen konnten ebenfalls in normaler Haut erwachsener Personen nachgewiesen werden und interessanterweise konnte ein Anstieg dieser Ablagerungen mit zunehmendem Alter und Sonnenbestrahlung festgestellt werden (*Dahlbäck et al., 1989*). Wo dieses Vitronektin ursprünglich entstanden ist - ob es aus dem Plasma stammt oder ob eventuell Hautzellen in der Lage sind, Vitronektin zu produzieren - konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , ein Vitronektin-Rezeptor, wurde auf kultivierten Melanomzellen nachgewiesen (*Cheresh and Spiro, 1987*), ebenso konnten die Existenz der Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  auf der humanen Melanomzelllinie M21 gezeigt werden (*Sanders et al., 1992*). Es wird vermutet, daß eine Integrin-vermittelte zelluläre Adhäsion in Mechanismen der Tumorentstehung und des invasiven Wachstums transformierter Zellen integriert sein könnte (*Humphries et al., 1986; Felding-Habermann et al., 1992*). Unter Berücksichtigung der vermehrten Ansammlung von Vitronektin in sonnenexponierter, älterer Haut und der Tatsache, daß Vitronektinrezeptoren auf Melanomzellen existieren, liegt tatsächlich die Vermutung nahe, daß Vitronektin am Prozeß der Melanomentstehung beteiligt sein könnte. Bewiesen werden konnte diese Hypothese bis heute allerdings nicht.

Über die Förderung der Thrombozytenanheftung an verletzte Gefäßwände und gleichzeitige Förderung des Gerinnungsprozesses könnte Vitronektin entscheidend zur Wundheilung beitragen. Diese Förderung der Wundheilung ist mehrfach vermutet worden (*Stenn, 1981; Brown et al., 1991*), konnte aber ebenfalls bis heute nicht eindeutig bewiesen werden.

## 2 Aufgabenstellung

Eine große Anzahl von Untersuchungen zeigt die Freisetzung von POMC-Fragmenten aus der Hypophyse ins Blut unter physischer und psychischer Belastung („Streß“). Obwohl viele Effekte von ACTH,  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin bekannt sind, ist die Funktion dieser Peptide und damit auch der Sinn ihrer Freisetzung unter Streß bis heute unklar. Umfangreiche Forschung und die Überprüfung zahlreicher Hypothesen blieben erfolglos.

Der kürzliche Nachweis der POMC-Expression in der Haut weist auf eine mögliche Funktion von POMC-Fragmenten wie  $\beta$ -Endorphin in der Haut hin.

Auf der Suche nach der funktionellen Bedeutung des  $\beta$ -Endorphins sollte nach  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-Bindungsstellen auf Hautzellen gesucht werden. Um genügend Material für biochemisch-analytische Untersuchungen zur Verfügung zu haben, sollte mit einer Zelllinie gearbeitet werden. Die Keratinozytenzelllinie HaCaT schien hierfür geeignet.

Die Suche nach  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-Bindungsstellen auf Keratinozyten in Kultur und in Suspension schien die Möglichkeit zu bieten, sowohl die Existenz zellständiger als auch die Existenz nicht-zellständiger Bindungsstellen in Keratinozytenzellkulturen zu sondieren.

Der Nachweis von  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-Bindungsstellen auf Keratinozyten wäre mit einer autokrinen Funktion des Opioidpeptids in der Haut kompatibel, sofern das Peptid von diesen Zellen auch freigesetzt würde. Es sollte deshalb überprüft werden, ob die zur Freisetzung hypophysärer POMC-Fragmente führenden Stimuli auch aus Keratinozyten  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin freisetzen können.

Zuerst sollte nach einer Reihe von Vorversuchen nach Bindungsstellen auf Keratinozyten in Kultur gesucht werden. Im Verlauf der Untersuchung zeigte sich, daß offenbar eine Bindung über den C-Terminus des  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphins an Vitronektin in der Zellkultur stattfand, was dann einen Nachweis des Vitronektins in der Zellkultur mittels immunfluorometrischer Methodik notwendig machte. Es wurde dann notwendig zu zeigen, daß neben der Bindung an Vitronektin auch eine Bindung des  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphins an die Keratinozyten selbst stattfand. Dies wurde dann in der

Keratinocytenkultur durch Abdeckung der Vitronectin-Bindungsstelle sowie durch Nachweis der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Keratinocyten in Suspension erreicht.

Die Suche nach Bindungsstellen für  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) auf Keratinocyten der Zelllinie HaCaT sollte folgendermaßen durchgeführt werden:

Bei Nachweis einer Bindung des  $\beta_H$ -Endorphins sollten die Bindungscharakteristika wie Strukturspezifität, Zeitabhängigkeit, Reversibilität, Sättigbarkeit, Bindungsparameter  $K_D$  und  $B_{MAX}$  bestimmt werden. Dieses Vorgehen sollte bei allen gefundenen Bindungsstellen praktiziert werden.

Weiterhin sollte durch UVB-Stimulation eine Freisetzung von POMC-Fragmenten aus Keratinocyten provoziert und damit die Möglichkeit einer autokrinen Funktion von  $\beta_H$ -Endorphin bei Hautzellen aufgezeigt werden. Um eine umfassende Untersuchung der Frage nach einer möglichen ähnlichen Freisetzung der POMC-Fragmente aus Hautzellen in Anlehnung an die bekannte Freisetzung von POMC-Fragmenten aus der Hypophyse durchzuführen, wurde neben der Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin(1-31), einem Produkt des sog. „corticotrophen Systems“ auch die Freisetzung von N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin(1-31), einem Produkt des sog. „melanotropen Systems“ der Hypophyse geprüft. Um Informationen darüber zu erhalten, inwieweit auch andere hypophysäre Mechanismen in der Haut wirksam seien, wurde zusätzlich auch die Möglichkeit der Freisetzung von [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin aus Keratinocyten der Zelllinie HaCaT untersucht.

### 3 Geräte, Materialien, Substanzen, Lösungen, Computerprogramme

#### 3.1 Geräte und Materialien

Brutschrank	Heraeus Instruments, Inc.
Dialyseschlauch	Serva, Heidelberg
Extraktionsanlage	Werkstatt des MZG, Gießen
Einmalspritzen, Luer	Braun, Melsungen
Gamma-Zähler 1282 Compugamma CS	LKB, Wallac, Turku; Finnland
Glasmaterialien:	
Meßkolben	Schott, Mainz
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Glasbecher	Schott, Mainz
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Lyophilisator GT 02	Leybold Heraeus, Köln
Magnetrührer IKA	Janke und Kunkel KG, Staufen
Mikroprobenröhrchen (1 ml)	Beckman, München
Mikroskop Wilkovert S	Hund GmbH, Wetzlar
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Kalensee, Gießen
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten, verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Radiolab, Dreieich
Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen Cellstar (50 ml)	Greiner GmbH, Frickenhausen
Sarstedt-Röhrchen (3,5; 4,5; 13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator Varishaker AM 169	Dynatech, Denkendorf
Spannungsquelle	Elektrowerkstatt des MZI, Gießen
Speed-Vac-Konzentrator	Savant, Hicksville, USA

Taumler	Heidolph, Kelheim
Tischrührer (Vortexer)	Heidolph, Kelheim
Ultraschallbad Sonorex RK 102	Bandelin, Berlin
UVB-Lampe mit Eich-Sensor (UV-Meter)	Waldmann, Villingen
Waagen:	
Feinwaage	Mettler, Zürich, Schweiz
Tischwaage	Mettler, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zellkulturschalen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge Sovall RC-5B	Du Pont, Bad Homburg
Labofuge 400e	Heraeus Instruments, Inc.
Tischzentrifuge 5413	Eppendorf, Hamburg
Microfuge B	Beckman, München

### 3.2 Chemikalien, Reagenzien, Testsubstanzen

Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, München
Antikörper:	
Vitronectin-Antikörper	Preissner, Biochemisches Institut der JLU Gießen
TRITC-conjugated polyclonal goat-antirabbit-IgG	Sigma, München
Carbodiimid [1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)] (CDI)	Sigma, München
Carbonate buffered saline (CBS)	Sigma, München
Chloramin T	Merck, Darmstadt
DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2]octane)	Sigma, München
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Haemocyanin (KLH)	Sigma, München
Peptide:	
[Arginin <sup>8</sup> ]Vasopressin, human	Bachem, Heidelberg
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(1-5)	Friedrich, Virologie, Gießen



$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(1-9)	Friedrich, Virologie, Gießen
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(1-16)	Bachem, Heidelberg
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(1-27)	Novabiochem, Läfelfingen, Schweiz
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(1-31)	Novabiochem, Läfelfingen, Schweiz
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(27-31)	Friedrich, Virologie, Gießen
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(28-31)	Saxon, Hannover
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(29-31)	Sigma, München
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(30-31)	Sigma, München
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(31) [Glu]	Sigma, München
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(18-31)	Friedrich, Virologie, Gießen
$\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(2-17)	Friedrich, Virologie, Gießen
[Tyr <sup>22</sup> ] $\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(18-22)	Friedrich, Virologie, Gießen
[Ala <sup>32</sup> , Gly <sup>33</sup> , Gly <sup>34</sup> , Ala <sup>35</sup> ] $\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(28-35)	Friedrich, Virologie, Gießen
N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub> -Endorphin(1-31)	Bachem, Heidelberg
Oxytocin, bovine	Sigma, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salze	
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Thiomerosal	Merck, Darmstadt
Tris	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, München

### 3.3 Lösungen

#### Puffer C

20mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 0,01% (w/v) bovines Serumalbumin, 0,1% (w/v) Gelantine, 0,01% (w/v) Thiomerosal, pH 7,5

#### Puffer D

Entspricht Puffer C, zusätzlich 0,1% Triton X-100 (v/v)

#### Dulbecco`s PBS (D-PBS)

0,9 mM  $\text{CaCl}_2$ /0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ /2,68 mM KCl/136,9 mM NaCl/1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4

„PBS defic“ (phosphat gepufferte Kochsalzlösung ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ )  
entspricht D-PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$

#### Phosphatpuffer für Jodierung

0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5

#### Trypsin-Lösung

Trypsin 0,05%, EDTA 0,02%

### 3.4 Computerprogramme

#### EBDA

(equilibrium binding data analysis);  
including LIGAND, Version 3.0

G.A. McPherson, 1986  
Elsevier-Biosoft, Cambridge,  
GB

#### Excel 95

Microsoft Software, Inc

#### Microcal ORIGIN 3.5 + 5.0

MicroCal Software, Inc

#### Word für Windows 97

Microsoft Software, Inc

## **4 Methoden**

### **4.1 Untersuchungen zu Nachweis und Charakterisierung der Bindung von $\beta_H$ -Endorphin(1-31) an Keratinozyten und weitere Bestandteile von Keratinozytenzellkulturen**

#### **4.1.1 Binder und Liganden**

##### **4.1.1.1 Binder**

Von besonderem Interesse für diese Arbeit war die Bindung des Opioidpeptids  $\beta_H$ -Endorphin in Keratinozytenzellkulturen. In der Zellkultur waren mehrere mögliche Binder für diesen Liganden zu erwarten.

##### **4.1.1.1.1 Keratinozyten**

Keratinozyten bilden zu 90% die oberste Schicht der Haut - die Epidermis. Die Epidermis ist ein geschichtetes Plattenepithel, welches neben Keratinozyten Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen enthält.

In dieser Arbeit wurden Keratinozytenzellkulturen verwendet. Es handelte sich um Kulturen der Zelllinie HaCaT.

##### **4.1.1.1.1.1 Keratinozytenzelllinie HaCaT**

HaCaT ist eine beständige epitheliale Zelllinie des erwachsenen Menschen, die in vitro normale Differenzierung zeigt und somit ein vielversprechendes Werkzeug zum Studium der Regulation und Funktion der menschlichen Haut darstellt (*Boukamp et al., 1988*).

Es handelte sich um eine robuste, immortalisierte und nicht maligne Zelllinie, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. N.E. Fusenig aus Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde. Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen p36 bis p50 (eine Passage bedeutet das Herauslösen von Zellen aus dem Zellverband und erneute Kultivierung mit Vermehrung der Zellen) verwendet.

#### **4.1.1.1.1.2 Züchtung adhärenter Keratinozyten in HaCaT-Zellkulturen**

Die Keratinozyten wurden in Zellkulturschalen von 35 mm Durchmesser in DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) mit fetalem Kälberserum (FCS) in einer Konzentration von 10%, 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C im Brutschrank kultiviert. In Versuchen zur Untersuchung der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung direkt an adhärenente Keratinozyten unter Ausschluß weiterer Binder wurde der Anteil des fetalen Kälberserums auf 1% reduziert, um den Anteil von Vitronektin in der Zellkultur zu minimieren; in diesen Versuchen wurden Zellkulturschalen von 100 mm Durchmesser eingesetzt.

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mittels Trypsineinwirkung (siehe 4.1.1.1.1.3) aus dem Zellverband herausgelöst und erneut auf Zellkulturschalen (Ø 100 mm oder 35 mm) ausgesät. Am Versuchstag waren die Zellen zur 100%igen Konfluenz (Monolayer) herangewachsen.

#### **4.1.1.1.1.3 Herstellung einer Zellsuspension aus HaCaT-Zellkulturen**

Die konfluenten Keratinozyten in den Zellkulturschalen wurden in Gruppen von fünf bis sechs Schalen jeweils aus dem Brutschrank herausgenommen. Es folgte die Abnahme des Überstandes und das einmalige Waschen mit 5 ml PBS defic (D-PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, 37°C). Im nächsten Schritt wurden 5 ml Trypsin-Lösung (Trypsin 0,05%, EDTA 0,02% gelöst in PBS defic, 37°C) aufgegeben und die Zellen ca. 20 min, bis zur vollständigen Ablösung, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen in einem 50 ml Röhrchen gesammelt, die Suspension bei 280 x g über 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und

verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschriffe, in denen 15 ml PBS defec auf das Zellpellet aufgegeben, die Zellen vorsichtig resuspendiert und erneut bei 280 x g für 5 min zentrifugiert wurden. Beim letzten Waschgang wurde auf die Zentrifugation verzichtet und statt dessen ein Aliquot entnommen. Durch Bestimmung der Zellzahl eines Tropfens dieser Suspension in einer Neubauer-Zählkammer, konnte die Zellkonzentration ermittelt werden. Im Anschluß erfolgte eine erneute Zentrifugation, der Überstand wurde verworfen und die Zellen ein letztes Mal in einem entsprechenden Volumen PBS defec resuspendiert, so daß sich ca. 20 bis 25 Mio. (oder in einigen Versuchen auch 50 Mio.) Zellen/ml in der Suspension befanden. Die Zellen wurden während des Verarbeitungsprozesses auf Eis gelagert.

#### **4.1.1.1.1.4 Zellzählung**

Um in Versuchen mit Zellkulturen die Zellkonzentration/Schale bestimmen zu können, wurden bei jedem Versuch drei Schalen für die Zellzählung zurückbehalten. Die Zellen wurden wie folgt verarbeitet: Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, die Zellen mit PBS defec (Hälfte des abgenommenen Überstandvolumens) gewaschen und mit Trypsin-Lösung (Hälfte des Überstandvolumens) versetzt. Dann erfolgte die ca. 20 min. Inkubation bis zur vollständigen Ablösung der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Von der entstandenen Zellsuspension wurden nach ausgiebiger Resuspension je drei Aliquots entnommen und jeweils die Anzahl der Zellen eines Tropfens der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Zellzählung der Keratinozyten in den Suspensionsversuchen erfolgte, wie bereits beschrieben, durch Bestimmung der Zellkonzentration während der Suspensionsherstellung in einer Neubauer-Zählkammer (s. 4.1.1.1.1.3).

#### 4.1.1.1.2 Nicht-zelluläre Bestandteile von Keratinozytenzellkulturen

##### 4.1.1.1.2.1 Nicht identifizierte Binder von $\beta_H$ -Endorphin in der HaCaT-Zellkultur

Zur Sondierung der nicht zellulären Binder in der Zellkultur HaCaT wurden Versuche in Zellkulturschalen mit verschiedenen Zusätzen durchgeführt.

Diese Experimente wurden in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm wie von 100 mm durchgeführt. Folgende Varianten wurden untersucht:

1. Zellkulturschalen mit der Keratinozytenkultur HaCaT, die wie unter 4.1.1.1.2 beschrieben behandelt wurden.
2. Kulturschalen, denen DMEM mit 100 units/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin zwei Tage vor Versuchsbeginn zugesetzt wurde. Das DMEM enthielt entweder 1%, 5% oder 10% FCS. Der entscheidende Unterschied gegenüber Ansatz 1 war das Fehlen von Keratinozyten.
3. Kulturschalen, denen ausschließlich DMEM, 100 units/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin zwei Tage vor Versuchsbeginn zugesetzt wurde. Keratinozyten und FCS fehlten.

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 4.1.2.1.1ff beschrieben.

##### 4.1.1.1.2.2 Identifizierte Binder von $\beta_H$ -Endorphin in der HaCaT-Zellkultur: Vitronektin

Dem Kulturmedium DMEM wurde u.a. FCS in Konzentrationen von 10% bzw. 1% zugesetzt. FCS enthält ebenso wie humanes Serum substantielle Mengen an Vitronektin. Vitronektin scheint eines der wichtigsten Adhäsionsfaktoren für das Zellwachstum in Kultur zu sein (*Hayman et al., 1985*). Daneben besteht die Möglichkeit, daß Vitronektin als Bestandteil der Extrazellulären Matrix von den Zellen exprimiert wird (*Hayman et al., 1983*).

#### 4.1.1.1.2.2.1 Identifizierung über Bindungscharakteristika

Die Untersuchung der Bindung von  $\beta_H$ -Endorphin in Keratinozytenkulturen der Zelllinie HaCaT erbrachte den Hinweis auf eine Bindung mit den Charakteristika einer  $\beta_H$ -Endorphin–Vitronektin-Interaktion. Die Charakterisierung der Bindungsstellen erfolgte nach den klassischen Kriterien der Ligand-Binder-Interaktion (*Burt, 1978*). Zu diesen Kriterien zählen Strukturspezifität, Zeitabhängigkeit, Reversibilität, Sättigbarkeit und die Bestimmung von  $K_D$  und  $B_{MAX}$  (siehe 4.1.4).

#### 4.1.1.1.2.2.2 Identifizierung über Fluoreszenzmikroskopie

Zur Identifizierung und Lokalisierung von Vitronektin in der Keratinozytenzellkultur wurden Vitronektin-Antikörper eines polyclonalen Kaninchenantisera (Code:  $\alpha S$  66/67) eingesetzt. Die Lokalisation dieser Antikörper im histologischen Präparat erfolgte mittels eines Fluoreszenz-markierten Anti-Kaninchenserum-Antikörpers der Ziege. Die Vitronektin-Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. Dr. K.T. Preissner vom Biochemischen Institut der JLU-Gießen zur Verfügung gestellt.

Für die Untersuchung erwies sich eine von Andersen-Beckh et al. beschriebene Methode als besonders geeignet (*Andersen-Beckh et al., 1999*).

### Kultivierung der Zellen

$5 \times 10^5$  Keratinozyten der Zelllinie HaCaT wurden auf 35 mm  $\varnothing$  Zellkulturschalen, auf denen sich 4 runde Glasplättchen (sog. „Cover slips“) befanden, ausgesät. Im Brutschrank bei 37°C wuchsen die Zellen innerhalb von 4 Tagen zur vollständigen Konfluenz heran.

### Herstellung der Präparate

Die mit Zellen bedeckten „Cover slips“ wurden aus den Kulturschälchen herausgenommen, zweimal mit PBS defic gewaschen und die Zellen auf den Glasplättchen für 10 min in frisch angesetztem 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit PBS defic. (Für Experimente mit

permeabilisierten Zellen wurden die Zellen dann über 5 min in PBS defic mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert und im Anschluß erneut dreimal gewaschen).

Die Blockade der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch Aufgabe von 5% NGS (Normal Goat Serum) und anschließend 20 min. Inkubation im Brutschrank.

Im Anschluß wurden die Plättchen je 3 x 5 min mit PBS gewaschen und dann je in ein 35 mm Ø Zellkulturschälchen gegeben.

Dann erfolgte die Aufgabe des polyklonalen Vitronektin-Antiserums in den Verdünnungen 1:100 und 1:200.

Anschließend inkubierten die Plättchen für 1 h bei 37°C im Brutschrank.

Nach einem erneuten 10 min. Waschschrift mit PBS, erfolgte die Aufgabe von 30 µl des 2. Antikörpers (TRITC-conjugated polyclonal goat-antirabbit-IgG) in den Verdünnungen 1:150 und 1:75.

Nach dreimaligem Waschen über 10 min mit PBS wurden die „Cover slips“ mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger mit einem Tropfen DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2]octane) gelegt und mit Nagellack fixiert.

Bis zur Ansicht unter dem Fluoreszenz-Mikroskop erfolgte die Lagerung bei 4°C.

## **Auswertung**

Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle Prof. Dr. R. Haberberger vom Anatomischen Institut der JLU-Gießen, der für uns freundlicherweise die Auswertung vornahm.

Die Darstellung des markierten Vitronektins erfolgte unter dem Mikroskop BX 60 (OLympus, Hamburg, Germany)

### **4.1.1.2 Liganden**

Zum Nachweis und zur Charakterisierung der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen wurden  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmente oder das gesamte Peptid  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) eingesetzt. Einige wenige Versuche erfolgten mit  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmenten anderer Spezies.  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) wurde unmarkiert oder radioaktiv markiert eingesetzt.



#### 4.1.1.2.1 Nicht markierte Peptide

Es wurden hauptsächlich  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) und  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmente im Bindungsversuch eingesetzt. In einigen Fällen erfolgte der Einsatz von  $\beta_H$ -Endorphin anderer Spezies, [Arginin<sup>8</sup>]-Vasopressin und N-Acetyl  $\beta_H$ -Endorphin(1-31). Zur Untersuchung der Strukturspezifität, Zeitabhängigkeit und Reversibilität der Bindung wurden Peptide in  $10^{-4}$  M Konzentration, für Verdrängungskurven in ansteigenden Konzentrationen ( $10^{-9}$  bis  $10^{-3}$  M) verwendet.

Synthetisch hergestellte Peptide wurden von den Firmen Sigma, Novabiochem, Bachem und Peninsula oder von Frau Dr. Friedrich aus dem Institut für medizinische Virologie in Gießen bezogen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Für die Versuche wurden die Peptide dann in den jeweilig gewünschten Konzentrationen in Aqua bidest. mit 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA) (w/v) gelöst, aliquotiert und bis zum Versuchsbeginn erneut eingefroren ( $-20^\circ\text{C}$ ).

#### 4.1.1.2.2 Radioaktiv markierte Peptide

Es wurde hauptsächlich ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin(1-31) als radioaktiv markierter Ligand eingesetzt. In einigen wenigen Ausnahmen wurden aber auch Experimente mit ( $^{125}\text{I}$ )[Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin und ( $^{125}\text{I}$ )N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin(1-31) durchgeführt.

##### 4.1.1.2.2.1 Markierung mit $^{125}\text{Jod}$

Die Markierung von humanem  $\beta$ -Endorphin mit  $^{125}\text{Jod}$  erfolgte an den Tyrosin-Resten des Peptids nach der Chloramin T-Methode (*Hunter and Greenwood, 1962; Hazum et al., 1979*) mit Modifikationen (*Wiedemann and Teschemacher, 1986*).

In ein silikonisiertes 2 ml-Glasröhrchen wurden bei Raumtemperatur nacheinander 50  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer (0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5), 10  $\mu\text{l}$   $\beta_H$ -Endorphin-Lösung ( $5 \times 10^{-4}$  M in Aqua bidest.) und 1  $\mu\text{l}$   $\text{Na}^{125}\text{I}$  in NaOH (entsprechend 1,0 mCi) einpipettiert. Die Jodierungsreaktion wurde durch die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Chloramin-T-Lösung (20  $\mu\text{g}$  ChloraminT/ 10 $\mu\text{l}$  0,05 M Phosphatpuffer) gestartet und nach 30 s

durch Zugabe von 10 µl Natriummetabisulfit-Lösung (20 µg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/10 µl 0,05 M Phosphatpuffer) gestoppt. Alle Lösungen, außer Na<sup>125</sup>I, wurden auf Eis gelagert, die Jodierung erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Jodierung von N-Acetyl-β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) und von [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin erfolgte nach der gleichen Methode.

#### **4.1.1.2.2.2 Einsatz der radioaktiv markierten Peptide**

Die spezifische Aktivität des radioaktiv markierten Peptids (Tracer) wurde nach der Methode von Dias und Reichert (1982) bestimmt. Sie lag für (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) zwischen 255 und 655 Ci/mmol.

Im Bindungsversuch wurden die radioaktiv markierten Peptide mit 0,1%iger BSA-Lösung (0,1% BSA in Aqua bidest., w/v) verdünnt, bis in 50 bzw. 100 µl Tracer-Lösung je nach Versuchsansatz 100 000 bis 1 000 000 cpm (counts per minute) gemessen wurden.

Im Radioimmunoassay (RIA) wurden geringere Aktivitäten (1000 cpm in 20µl) eingesetzt.

#### **4.1.2 Bindungsversuche mit Keratinozytenzellkulturen**

Im folgenden wird der Versuchsaufbau zum Nachweis einer möglichen β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindung an Vitronectin und Keratinozyten in Keratinozytenzellkulturen beschrieben. Der Versuchsablauf orientierte sich an der von Schüle et al. (1996) beschriebenen Bindungsmethode.

##### **4.1.2.1 Suche nach Bindungsstellen für β<sub>H</sub>-Endorphin in Keratinozytenzellkulturen: Nachweis der Bindung an Vitronectin**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte für diese Versuchsreihe auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm (ca. 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/Schale) wie unter Punkt

4.1.1.1.1.2 beschrieben. Das Kulturmedium DMEM enthielt in dieser Versuchsreihe 10% FCS.

#### **4.1.2.1.1 Versuchsdurchführung**

Die Zellen wurden aus dem Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) genommen und nach Kontrolle ihrer 100%igen Konfluenz unter dem Mikroskop auf einer Aluminiumschale in Eis eingebettet. Der Überstand (ca. 2 ml) wurde abgenommen und verworfen. Es folgte ohne Verzögerung, um die Zellen von dem Austrocknen zu schützen, ein Waschgang mit 2 ml D-PBS (mit 0,1% BSA, w/v). Im Anschluß erfolgte die Aufgabe der Komponenten der Inkubationslösung (1ml) auf die Zellen, die sich wie in Tabelle 1 beschrieben zusammensetzte. Durch sanfte Bewegung der Schalen wurde die Durchmischung des Inkubates sichergestellt.

Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei 0°C inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen, die Zellen dreimal mit 3 ml D-PBS gewaschen und dann mit 1 ml NaOH (0,1 N) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und damit lysiert. Das Lysat eines jeden Ansatzes wurde in ein Sarstedt-Röhrchen pipettiert. Die Zellkulturschale wurde mit 1 ml BSA-Lösung gespült und die Spüllösung ebenfalls ins entsprechende Röhrchen gegeben.

Die Bestimmung der Radioaktivität im Röhrchen erfolgte im Gamma-Counter, die Zählzeit betrug 1 min.

#### **4.1.2.1.2 Inkubationsansätze**

Das Volumen des Inkubates betrug 1000 bzw. 1040 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

	D-PBS (+0,1% BSA)	$\beta_H$ -Endorphin bzw. $\beta_H$ - Endorphin-Fragmente (in 0,1% iger BSA- Lösung)	$[^{125}\text{I}]\beta_H$ -Endorphin (in 0,1% iger BSA-Lösung) (ca. 200 000 cpm)
B <sub>0</sub> -Ansatz	900 $\mu\text{l}$	-	100 $\mu\text{l}$
Kompetitions-Ansatz (VD)	900 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
C <sub>T</sub> -Ansatz	-	-	100 $\mu\text{l}$
Viabilitätskontrolle	900 $\mu\text{l}$	-	-

**Tabelle 1** Zusammensetzung der Inkubationsansätze des  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsversuchs zur Untersuchung der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Vitronektin in Keratinozytenkulturen

#### **B<sub>0</sub>-Ansatz:**

Der B<sub>0</sub>-Ansatz diente der Ermittlung der Bindung des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphins an Vitronektin in Abwesenheit von Bindungsinhibitoren.

#### **Kompetitions-Ansatz:**

Mit den Kompetitionsansätzen wurde der Anteil der Bindung von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin an Vitronektin ermittelt, der sich durch Zugabe von unmarkiertem  $\beta_H$ -Endorphin oder eines seiner Fragmente in hoher Konzentration verdrängen ließ, z.B. beim Nachweis der Strukturspezifität.  $\beta_H$ -Endorphin und  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmente waren je nach Versuchsansatz in Konzentrationen von  $4 \times 10^{-11}$  bis  $4 \times 10^{-6}$  M im Ansatz enthalten.

#### **„C<sub>T</sub>“(total counts)-Ansatz:**

Zur Ermittlung der für jeden Einzelansatz zur Verfügung stehenden Radioaktivität, wurde die gleiche Menge an Tracer wie in den übrigen Ansätzen direkt in ein 4,5 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert und später mit den anderen Ansätzen zusammen gemessen. Den Ansätzen wurde eine Radioaktivität von jeweils ca. 200 000 cpm zugesetzt.

### **Viabilitätskontrolle:**

Zur Kontrolle der Zellviabilität während des Versuchs wurden Viabilitätskontrollen durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurde auf 3 Schalen die Zellkonzentration bestimmt (siehe 4.1.1.1.1.4).

Auf jeweils 3 weitere Schalen wurde das gleiche Überstandvolumen aufgegeben, es erfolgte aber keine Zugabe von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin. Die Ansätze durchliefen den Versuch analog zu den übrigen und nach Versuchsende wurde die Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und aus der Differenz der Zellkonzentration vor und nach dem Versuch die Anzahl der zugrunde gegangenen Zellen ermittelt.

### **4.1.2.1.3 Auswertung**

Im  $B_0$ -Ansatz wurde derjenige Anteil des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) bestimmt, der im Bindungsversuch in Abwesenheit von Bindungsinhibitoren („Verdrängern“) gebunden hatte.

In der Regel wurde die Bindung ( $B_{\%}$ ) als prozentualer Anteil der Gesamtmenge an ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) angegeben, die im Inkubationsansatz für die Bindung zur Verfügung stand. Diese Gesamtmenge wurde im „ $C_T$ “-Ansatz bestimmt.

$$B_{\%} = B_0 / C_T \times 100 [\%]$$

In den Verdrängungsexperimenten wurde die Bindung von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) in Anwesenheit verschiedener  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Fragmente untersucht. Die im Kompetitionsansatz in Anwesenheit eines potentiellen Verdrängers gemessene Bindung (VD) eines Experimentes wurde aus den Mittelwerten ( $x_{\text{mean}}$ ) von Triple-Ansätzen eines Experimentes ( $\pm$  Standardabweichung, SD) berechnet. Die in den Ergebnissen dargestellten Werte ergaben sich aus der Mittelung der VDs aus 2-4 Experimenten ( $\pm$  SD) und wurden als prozentualer Anteil ( $B_{\text{VD}}$ ) der Bindung ohne Verdrängersubstanz ( $B_0$ ) ausgedrückt.

$$B_{\text{VD}} = \text{VD} / B_0 \times 100 [\%]$$

Für eine spezifische Bindung ist eine hohe Affinität des Liganden zu seiner Bindungsstelle zu fordern.

Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  als Maß für die Affinität, sowie der Bindungsstellen-Konzentration  $B_{Max}$  erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) aus den Daten der Sättigungsexperimente (siehe 4.1.4).

#### **4.1.2.2 Suche nach Bindungsstellen für $\beta_H$ -Endorphin auf adhärenenten Keratinozyten in Zellkultur (unter Ausschluß der Bindung an Vitronektin)**

In diesen Versuchen wurde nach  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen auf Keratinozyten in Kultur gesucht. Für den Versuchsaufbau wurde ebenfalls die von Schüle et al. (1996) beschriebene Methode verwendet. Statt 35 mm-Schalen wurden allerdings Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm verwendet, in denen der am Schalenboden haftende Zellmonolayer ca.  $7,5 \times 10^6$  Zellen/Schale enthielt.

##### **4.1.2.2.1 Abdeckung der Vitronektin-Bindungsstelle**

Um eine Vitronektin-unabhängige  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung auf der Zelle nachweisen zu können, mußte zuvor die  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle auf Vitronektin in der Zellkultur blockiert werden. Der FCS-Anteil des Kulturmediums (DMEM) wurde in diesen Experimenten auf 1% reduziert, um die Konzentration des exogenen Vitronektins zu minimieren.

Die Bindung des  $\beta_H$ -Endorphins an Vitronektin erfolgte über seinen C-Terminus. Deshalb wurde zur vollständigen Blockade der C-terminalen Bindungsstelle das C-terminale Fragment des  $\beta_H$ -Endorphins,  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) in exzessiver Konzentration ( $10^{-2}$  M) dem Inkubationsansatz eine Stunde vor Versuchsbeginn zugesetzt.

#### 4.1.2.2.2 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung entsprach im wesentlichen der unter 4.1.2.1.1 beschriebenen Methode. Da statt der Schalen mit einem Durchmesser von 35 mm für diese Versuchsreihe 100 mm Ø Inkubationsschalen verwendet wurden, mußte das Inkubat-Volumen erhöht werden, damit eine vollständige Benetzung des Schalenbodens gewährleistet war. 5 ml reichten aus, um den Schalenboden und die dort ansässigen Zellen vollständig zu bedecken.

Nach Kontrolle der 100%igen Konfluenz unter dem Mikroskop, wurden die Keratinozytenkulturen auf eine in Eis eingebettete Aluminiumschale gestellt. Der Überstand (ca. 10 ml) wurde abgenommen und verworfen, der einmalige Waschprozeß mit 10 ml D-PBS (mit 0,1% BSA, w/v) erfolgte unverzüglich, um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen. Im Anschluß wurden die Lösungen des Reaktionsansatzes wie in Tabelle 2 beschrieben aufgegeben. Nach jeder Zugabe einer Lösung wurde der Flüssigkeitsspiegel über den Zellen leicht bewegt, um eine gute Durchmischung der Substanzen zu gewährleisten. Die Inkubationsansätze setzten sich aus  $B_0$ -, Kompetitions-, „ $C_T$ “- und Viabilität-Kontroll-Ansätzen zusammen (s. 4.1.2.1.2). Alle eingesetzten Lösungen wurden auf Eis gelagert.

Die Inkubation erfolgte über insgesamt drei Stunden auf Eis. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die auf dem Boden der Schale haftenden Zellen mit 10 ml D-PBS (4°C) dreifach gewaschen.

Zur Auflösung der Zellen wurde 5 ml NaOH (0,1 N) auf den Zellmonolayer pipettiert. Das Zellysat wurde nach 10 min. Inkubation mit der Natronlauge in Sarstedt-Röhrchen pipettiert, die Schale mit 2 ml BSA-Lösung (0,1% BSA in Aqua bidest., w/v) gespült und die Spüllösung ebenfalls in das entsprechende Röhrchen gegeben. Die Bestimmung der Radioaktivität in den Röhrchen erfolgte im Gamma-Counter, die Zählzeit betrug 1 min.

#### 4.1.2.2.3 Inkubationsansätze

Das Inkubat-Volumen der Inkubationsansätze betrug je 5000 bzw. 5200  $\mu\text{l}$ . Die einzelnen Ansätze setzten sich wie folgt zusammen (Erläuterungen zu den Ansätzen siehe 4.1.2.1.2.):

	Uhrzeit (min)	$\beta_{\text{H}}$ -End.(27-31), in 0,1% iger BSA-Lösung	$\beta_{\text{H}}$ -End.(1-31) und $\beta_{\text{H}}$ - Endorphin- Fragmente, in 0,1% BSA- Lösung	D-PBS (+0,1%BSA)	( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ - Endorphin in 0,1% iger BSA- Lösung (ca. 1000000 cpm)
B <sub>0</sub> -Ansatz	0	2000 $\mu\text{l}$	-	2500 $\mu\text{l}$	-
	60	-	-	-	500 $\mu\text{l}$
Kompetitions- Ansatz (VD)	0	2000 $\mu\text{l}$	-	2500 $\mu\text{l}$	-
	30	-	200 $\mu\text{l}$	-	-
	60	-	-	-	500 $\mu\text{l}$
C <sub>T</sub> -Ansatz	60	-	-	-	500 $\mu\text{l}$
Viabilitäts- kontrolle	0	-	-	5000 $\mu\text{l}$	-

**Tabelle 2** Zusammensetzung der Inkubationsansätze des  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindungsversuchs zur Untersuchung der  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten in Keratinozytenkulturen

#### 4.1.2.2.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte wie unter 4.1.2.1.3 beschrieben.

#### 4.1.3 Bindungsversuche mit Keratinozyten in Suspension

Die Zellen wurden wie unter 4.1.1.1.1.2 beschrieben kultiviert und auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät ( $7,5 \times 10^6$  Zellen/Ansatz). Das Zellkulturmedium enthielt 10% FCS.



Die Versuche wurden mit  $10^7$  Zellen/Ansatz durchgeführt.

Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte auf einem „Taumler“, der durch schonende Bewegung die Konvektion der Ansätze gewährleistete.

#### **4.1.3.1 Versuchsdurchführung**

Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte wie unter 4.1.1.1.3 beschrieben.

Die Versuchsansätze wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen auf Eis wie in Tabelle 3 beschrieben pipettiert und gut resuspendiert. Dann wurden aus jedem Ansatz 200 µl herausgenommen und auf den Boden eines 13 ml Sarstedt-Röhrchens gegeben. Die Sarstedt-Röhrchen wurden in Eis eingebettet und auf einem „Taumler“ für zwei Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden aus jedem Sarstedt-Röhrchen je 170 µl entnommen und auf 200 µl 20%ige Saccharose-Lösung (20% Saccharose in Aqua bidest., w/v) in ein Beckman-Mikrofuge-Gefäß (0,5 ml) aufgeschichtet. Dieses wurde im Anschluß bei  $8000 \times g$  10 min zentrifugiert. Die Spitzen der Beckman-Gefäße mit den Zellen wurden abgeschnitten, in Polystyrol-(„RIA“-) Röhrchen aufgefangen und die Radioaktivität im Zellpellet im Gamma-Counter bestimmt. Die Zählzeit betrug 1 min.

#### **4.1.3.2 Inkubationsansätze**

Die Inkubationsansätze setzten sich wie in Tabelle 3 gezeigt zusammen.

	Zellen in PBS defic	0,1% ige BSA- Lösung	PBS defic	( <sup>125</sup> I)β <sub>H</sub> - Endorphin in 0,1% iger BSA- Lösung (ca. 1000000 cpm)	β <sub>H</sub> - Endorphin(1- 31) bzw. β <sub>H</sub> - Endorphin- Fragmente in 0,1% iger BSA- Lösung
B <sub>0</sub> -Ansatz	250 µl	20 µl	-	50 µl	-
Kompetitions- Ansatz (VD)	250 µl	-	-	50 µl	20 µl
Blank- Ansatz(B <sub>L</sub> )	-	-	270 µl	50 µl	-
C <sub>T</sub> -Ansatz	-	-	-	50 µl	-
Viabilitätskon- trolle	250 µl	-	70 µl	-	-

**Tabelle 3** Zusammensetzung der Inkubationsansätze des β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindungsversuchs zur Untersuchung der β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindung an Keratinozyten in Suspension

#### **B<sub>0</sub>-Ansatz:**

Die B<sub>0</sub>-Ansätze dienten der Ermittlung der (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindung in Abwesenheit von Inhibitoren („Verdrängern“) an Keratinozyten.

#### **Kompetitions-Ansatz (VD):**

Kompetitions-Ansätze dienten der Ermittlung des Anteils der Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin an Keratinozyten, der sich durch Zugabe von unmarkiertem β<sub>H</sub>-Endorphin oder eines seiner Fragmente in hoher Konzentration verdrängen ließ, z.B. bei der Untersuchung der Strukturspezifität der Bindung.

#### **„Blank“-Ansatz (B<sub>L</sub>):**

„Blank“-Ansätze dienten der Ermittlung der Radioaktivität, die in Abwesenheit von Zellen während der Zentrifugation der Ansätze in der Beckman-Mikrofuge in die Spitze der Gefäße, die dann abgeschnitten wurden, gelangte. Der Geräte-Leerwert des Gammazählers floß hier mit ein.

**„C<sub>T</sub>“(total counts)-Ansatz:**

Zur Ermittlung der für jeden Einzelansatz zur Verfügung stehenden Radioaktivität wurde das gleiche Tracervolumen wie in den übrigen Ansätzen direkt in ein Sarstedt-Röhrchen pipettiert und die Aktivität später mit den anderen Ansätzen zusammen gemessen. Jedem Ansatz wurde eine Radioaktivität von ca. 1 000 000 cpm zugesetzt.

**Viabilitätskontrolle:**

Zur Kontrolle der Zellviabilität während des Versuchs wurden in jedem Versuch drei Ansätze erstellt. Vor Versuchsbeginn wurde in diesen Ansätzen die Zellkonzentration/Ansatz in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Ansätze durchliefen den Versuch dann analog zu den übrigen und nach Versuchsende wurde durch Bestimmung der vitalen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer und Berechnung der Differenz zu der Zählung vor Versuchsbeginn die Anzahl der zugrunde gegangenen Zellen bestimmt.

**4.1.3.3 Auswertung**

Die Bindung (B), d.h. der Anteil des (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphins, der an die Keratinozyten gebunden hatte, ergab sich aus der Differenz der Zählrate des B<sub>0</sub>- bzw. VD-Ansatzes und der des Blank-Ansatzes (B<sub>L</sub>).

$$B = B_0 \text{ (bzw. VD)} - B_L \text{ [cpm]}$$

Meistens wurde die Bindung als prozentualer Anteil der Gesamtmenge (B<sub>%</sub>) an (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin ausgedrückt, die im Inkubationsansatz zur Verfügung stand.

Die prozentuale Bindung (B<sub>0%</sub>) ergab sich aus den Zählraten der C<sub>T</sub>-Ansätze und den Zählraten der B<sub>0</sub>-Ansätze (abzüglich der Blankwerte) wie folgt:

$$B_0(\%) = (B_0 - B_L / C_T - B_L) \times 100 \text{ [%]}$$

Die in den Verdrängeransätzen in Anwesenheit eines potentiellen Verdrängers gemessene Bindung (VD) wurde als prozentualer Anteil  $B_{VD}(\%)$  der Bindung ohne Verdrängersubstanz ( $B_0$ ) ausgedrückt:

$$B_{VD}(\%) = (VD - B_L / B_0 - B_L) \times 100 [\%]$$

#### 4.1.4 Charakterisierung der spezifischen Bindung von $\beta_H$ -Endorphin

Eine spezifische Bindung muß gewisse Kriterien einer Ligand-Binder-Interaktion erfüllen (*Burt, 1978*).

Folgenden Kriterien mußte demnach auch die  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung genügen:

- **Zeitabhängigkeit**

Diese Versuchsanordnung diente der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Assoziation des Liganden an die Bindungsstelle (ON-Kinetik). Mit ihrer Hilfe konnte auch der Zeitpunkt, an dem die Bindungsreaktion ihren Gleichgewichtszustand erreicht hatte, ermittelt werden, wovon sich die Standardinkubationsdauer ableiten ließ.

- **Reversibilität**

Die Reversibilität ist ein weiteres wichtiges Kriterium zum Nachweis der spezifischen Bindung. Hierfür wurden erst Binder und radioaktiv markierter Ligand zusammen inkubiert, bis der Ligand die Bindungsstellen besetzt hatte. Dann wurde der unmarkierte Ligand im Überschuß hinzugegeben und in regelmäßigen Abständen die Bindung des Radioliganden überprüft. Eine Verdrängung des radioaktiv markierten Liganden durch den nicht markierten Liganden („Chase-Experiment“) belegt die Reversibilität der Bindung des markierten Liganden.

Der Versuch wird auch als OFF-Kinetik bezeichnet.

- **Sättigbarkeit**

Die Bindung eines Liganden an seine spezifischen Bindungsstellen ist sättigbar, da diese Bindungsstellen, im Gegensatz zu den theoretisch unbegrenzt vorhandenen unspezifischen Bindungsstellen, in nur endlicher Zahl vorkommen.

Es wurden in jeden Ansatz gleiche Mengen an radioaktiv markiertem Liganden gegeben. Bei Zugabe steigender Konzentrationen an nicht markiertem Liganden in die verschiedenen Ansätze konkurrierten markierter und unmarkierter Ligand zunehmend zugunsten des nicht markierten Liganden um die begrenzte Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen.

Die Sättigung der Bindungsstellen bei steigenden Konzentrationen an nicht markiertem Liganden geht Hand in Hand mit einer „Verdünnung“ der Konzentration des markierten Liganden, die als seine „Verdrängung“ von der Bindungsstelle interpretiert wird.

- **Strukturspezifität**

Die strukturelle Spezifität der Interaktion des Binders mit dem Liganden konnte durch Verdrängungsexperimente mit Substanzen nachgewiesen werden, die in unterschiedlichem Grade Strukturhomologien zum Liganden aufwiesen.

Als potentielle Verdränger wurden N- und C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmente sowie Mittelfragmente des  $\beta_H$ -Endorphins eingesetzt.

- **Affinität: Bindungsparameter  $K_D$  und  $B_{Max}$**

Für eine spezifische Bindung ist eine hohe Affinität des Liganden zu seiner Bindungsstelle zu fordern.

Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  als Maß für die Affinität, sowie der Bindungsstellen-Konzentration  $B_{Max}$ , erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) aus den Daten der Sättigungsexperimente. Das Programm ermittelte die Bindungsparameter durch iterative Anpassung des jeweilig gewählten Bindungsmodells an die Experimentaldaten. Darüber hinaus erlaubte es den statistischen Vergleich der Wahrscheinlichkeit von Modellen unterschiedlicher Komplexität, wie z.B. im Modell mit mehreren Bindungsstellen.

Die so erhaltenen Bindungsparameter wurden mittels konventioneller Scatchard-Analyse graphisch auf ihre Plausibilität hin überprüft. Für die Erstellung eines „Scatchard plots“ wurde der Quotient aus gebundenem zu freiem Liganden gegen die Konzentration des gebundenen Liganden aufgetragen. Die Dissoziationskonstante ergab sich aus der Steigung einer durch die Punkte verlaufende Gerade mit dem Wert  $-1/K_D$ . Die Bindungsstellenkonzentration im

Bindungsansatz ergab sich als Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse. Die Bestimmung der Geraden erfolgte mit Hilfe des Rechenprogrammes EBDA und durch erneute Berechnung der Daten im Computerprogramm EXCEL mit anschließender Zeichnung eines Scatchard-Diagramms im Computerprogramm ORIGIN zur Überprüfung der im LIGAND erstellten Daten.

## **4.2 Untersuchung zur Freisetzung von $\beta_H$ -Endorphin, N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin und [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin**

### **4.2.1 Stimulation adhärenter Keratinozyten (HaCaT) in Zellkultur**

Für die Durchführung dieser Versuche wurde im wesentlichen die von Chakraborty et al. (1996) beschriebene Methode verwendet.

Die Stimulation erfolgte ausschließlich mit UVB-Strahlung in drei verschiedenen Intensitäten. Die Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat stimuliert.

#### **4.2.1.1 Kultivierung der Zellen**

Die Zellen wurden wie unter 4.1.1.1.2 beschrieben kultiviert und ausgesät. Die Aussaat erfolgte auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm.

#### **4.2.1.2 UVB-Bestrahlung der Zellkultur**

Einen Tag nach Aussaat der Zellen erfolgte die Stimulation mit UVB in drei Intensitäten (10, 25 und 50 mJ/cm<sup>2</sup>). Es wurde eine PL-Lampe UVB mit einer Leistung von 8,54 mW/cm<sup>2</sup> (Vor-Eichung) im Meßbereich UV21, 290-320 nm und dem Peak bei 313 nm verwendet.

Die gewünschten Intensitäten wurden durch Variation der Bestrahlungszeit erreicht. Die Lampe wurde in einer Höhe von 15 cm über dem zu bestrahlenden Objekt angebracht. Die Bestrahlungszeit ließ sich folgendermaßen berechnen:

Zuerst wurde mit einem UV-Meter die UV-Intensität in  $\text{mW}/\text{cm}^2$  15 cm unter der Lampe gemessen. Diese variierte minimal nach jedem Aufbau der UV-Lampe. Die gewünschte Intensität wurde durch den gemessenen Wert dividiert und das Ergebnis ergab die Bestrahlungszeit ( $\text{UV}_{\text{sec}}$ ) in Sekunden.

$$\text{UV}_{\text{sec}} = \frac{\text{gewünschte Intensität (Energie), z.B. } 10 \text{ [mJ/cm}^2 \text{ in } x \text{ sec.]} }{\text{gemessene Intensität (Leistung), z.B. } 0,5 \text{ [mJ/cm}^2 \text{ in } 1,0 \text{ sec]}}$$

Nach Abnahme des Kulturmediums (DMEM) und Aufgabe von D-PBS ( $37^\circ\text{C}$ ) (um jegliche Absorption der Strahlung durch die Komponenten des DMEM zu vermeiden) wurden jeweils drei Schalen mit der gleichen Intensität bei Raumtemperatur bestrahlt. Im Anschluß an die Bestrahlung erfolgte der unverzügliche Austausch des Puffers mit dem Kulturmedium, um das Nährstoffdefizit der Zellen so gering wie möglich zu halten. Dieses bestand maximal 15 min. Nach durchgeführter Stimulation verblieben die Kulturen die folgenden 24 Stunden bis zur Aufarbeitung der Überstände und Zellen im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ .

Drei Zellkulturen wurden wie oben beschrieben behandelt, sie wurden aber keiner UV-Strahlung ausgesetzt. Sie dienten als Kontrollen zum späteren Vergleich der Zellkonzentrationen und der Ergebnisse mit denen der bestrahlten Zellen.

#### **4.2.2 Aufarbeitung der Zellen und der Zellkultur-Überstände**

Die stimulierten Zellen wurden ca. 24 Stunden nach der Stimulation aus dem Brutschrank herausgenommen und bei Raumtemperatur verarbeitet.

##### **4.2.2.1 Herstellung von Proben aus Zellkulturüberständen**

Es erfolgte die Abnahme der Überstände von den Schalen und das Poolen der Überstände, die mit der gleichen Intensität bestrahlt worden waren. Die Überstände

wurden mit „Enzymhemmercocktail“ (Aprotinin 0,2%, Pefablock 20 mM, jeweils gelöst in Aqua bidest.) (1/2 = v/v) versetzt und mit 1 N HCL (4/1 = v/v) angesäuert (pH 3-3,5).

Im Anschluß wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung für mind. 10 Stunden eingefroren.

Nach dem Auftauen erfolgte die 30 min. Zentrifugation der Proben bei 16 000 x g und die weitere Verarbeitung durch Extraktion (siehe 4.2.3)

#### **4.2.2.2 Herstellung von Zellysaten**

Nach Abnahme des Zellüberstands wurden die Zellen mit PBS defic gewaschen, 5 ml Trypsin-Lösung (Trypsin 0,05%, EDTA 0,02%, gelöst in PBS defic, 37°C) aufgegeben und die Zellen bis zur vollständigen Ablösung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluß wurden alle Zellen, die mit der gleichen UV-Intensität bestrahlt oder nicht bestrahlt worden waren in einem 50 ml Röhrchen gesammelt, ein Aliquot wurde aus jedem Gefäß entnommen und die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es folgte eine 5 min. Zentrifugation bei 280 x g. Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und die Zellen in Trispuffer (1,2113g/l Tris[-hydroxymethyl]aminomethan, 10 mM gelöst in Aqua bidest.) und „Enzymhemmercocktail“ (Aprotinin 0,2%, Pefablock 20 mM, jeweils gelöst in Aqua bidest.) resuspendiert (1/2 = v/v). Es folgte eine erneute Inkubation für 30 min bei 4°C. Im Anschluß wurden die Zellsuspensionen für mindestens 10 Stunden bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Ultraschallbad lysiert. Im Anschluß wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit 0,005 N HCL angesäuert und 30 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und extrahiert (siehe 4.2.3.1.).



## **4.2.3 Extraktion von Zellkultur-Überständen und Zellysaten**

### **4.2.3.1 Durchführung des Extraktionsverfahrens**

Die Extraktion der Überstände und Lysate erfolgte über die Extraktionsanlage. Auf die Anlage wurden nach einander zur Aktivierung folgende Lösungen (pro Kartusche) aufgegeben: 5 ml Methanol, 5 ml Harnstoff (8 M) und 10 ml Aqua bidest. Im 2. Schritt erfolgte die Aufgabe des Zellüberstandes bzw. -lysates (jeweils 5 ml/Kartusche). Im 3. Schritt wurden die Kartuschen mit 10 ml Aqua bidest. und 10 ml Essigsäure (4%) gewaschen. Im 4. Schritt folgte die Elution. Dafür wurden unter den Kartuschen Auffanggefäße plziert und 10 ml 1-Propanol (96%)/Essigsäure (4%) aufgegeben. Das Eluat wurde in den Auffanggefäßen aufgefangen und diese entfernt. Es folgte die Reaktivierung der Anlage mit folgenden Lösungen: 10 ml Essigsäure (4%), 10 ml Aqua bidest und 5 ml Harnstoff (8 M). Mit der Aufgabe von 5 ml Methanol wurde die Extraktion beendet.

Nach der Extraktion wurden die Proben für zwei Stunden bei 4°C gelagert und dann im Speed Vac-Konzentrator über Nacht (10-12 h) getrocknet. Im Anschluß erfolgte die Aufgabe von 500 µl Aqua bidest./Probe und das Einfrieren bei -20°C für mind. zwei Stunden. Im nächsten Schritt wurden die Proben lyophilisiert (mind. 10 h). Dann wurden die Lyophilisate in 500 µl Puffer C zwei Stunden schüttelnd bei 4°C gelöst und im Anschluß aliquotiert. Die anschließende Peptidbestimmung erfolgte im Fluid Phase Radioimmunoassay.

### **4.2.3.2 Standardisierung des Extraktionsverfahrens**

Um bei der späteren Auswertung der Proben im Radioimmunoassay (RIA) die Peptidkonzentration bestimmen zu können, mußten Standardproben erstellt werden, denen eine definierte Peptidkonzentration zugesetzt wurde.

#### 4.2.3.2.1 Gewinnung von Zellen und Zellkultur-Überständen

Die Keratinozyten wurden wie unter 4.1.1.1.2 beschrieben kultiviert und auf Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 oder 100 mm ausgesät. Es erfolgte keine UV-Stimulation. Zwei Tage nach der Aussaat wurden die Zellüberstände und –lysate aufgearbeitet.

#### 4.2.3.2.2 Ansetzen und Extraktion von Extraktionsstandardproben

Die Aufarbeitung der Zellüberstände erfolgte wie unter 4.2.2ff. beschrieben. Je 5 ml Überstand wurde in ein 10 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert und diesen 10 µl Peptid ( $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin, N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin oder [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin) in ansteigenden Konzentrationen (10 – 1000 fmol/Ansatz) zugesetzt. Erst danach wurden die Überstände mit je 200 µl HCL (1 N) angesäuert und eingefroren. Die Extraktion erfolgte wie unter 4.2.3 beschrieben.

Die Aufarbeitung der Zellysate verlief ebenfalls wie unter 4.2.2ff. beschrieben. Nach der Lyse der Zellen im Ultraschallbad und der anschließenden Zentrifugation der Proben wurde der Überstand abgenommen und filtriert.

Die Filtration erfolgte über eine Extraktionsanlage: Die Anlage wurde bestückt mit max. 20 Kartuschen. Im Anschluß erfolgte die Aufgabe der verschiedenen Substanzen : Die Anlage wurde aktiviert durch die Aufgabe von 5 ml Methanol, 5 ml Harnstoff (6-8 M) und 10 ml Aqua bidest. (pro Kartusche). Dann wurden unter die Kartuschen jeweils Auffangbehälter platziert und in diesen die im Anschluß aufgegebenen Zellysatüberstände aufgefangen.

Das Filtrat wurde in einem Becherglas gesammelt. Je 2,5 ml Filtrat wurde in ein 10 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert und diesen 20 µl Peptid ( $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin, N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin oder [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin) in ansteigenden Konzentrationen (10 – 1000 fmol/Ansatz) zugesetzt. Dann erfolgte das Ansäuern mit je 2,5 ml HCL (0,005 N). Vor der Extraktion wurden alle Ansätze für mindestens zwei Stunden bei -20°C eingefroren.

Die Extraktion erfolgte nach der Zentrifugation (30 min bei 16 000 x g) wie unter 4.2.3 beschrieben.

Nach der Extraktion wurden alle Proben (Überstände und Lysate) für zwei Stunden bei 4°C gelagert und dann im Speed Vac-Konzentrator über Nacht (10-12 h) getrocknet. Im Anschluß erfolgte die Aufgabe von 500 µl Aqua bidest./Probe und das Einfrieren bei -20°C für mind. zwei Stunden. Im nächsten Schritt wurden die Proben lyophilisiert (mind. 10 h). Dann wurden die Lyophilisate in 500 µl Puffer C zwei Stunden schüttelnd bei 4°C gelöst und im Anschluß aliquotiert. Die anschließende Peptidbestimmung erfolgte im Fluid Phase Radioimmunoassay.

#### **4.2.4 Analyse der Extrakte mittels Radioimmunoassay (RIA)**

##### **4.2.4.1 Herstellung eines polyklonalen Antiserums zwecks Einsatz in einem One-Site Fluid Phase-RIA**

Der FP RIA ist eine bewährte Methode zum Nachweis von Peptiden. Hierbei konkurrieren ein radioaktiv markiertes und ein nicht markiertes Antigen um die Bindungsstelle eines Antikörpers. Zur Durchführung werden gegen das nachzuweisende Peptid gerichtete spezifische Antikörper benötigt. Die Gewinnung von  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin(1-31)-, N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin(1-31)- und [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-Antikörpern erfolgte in Kaninchen. Die Produktion eines polyklonalen Antiserums wird in den folgenden Punkten am Beispiel des [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressins (AVP) beschrieben.

Es wurden 3 graue Kaninchen verwendet. Diese wurden unter definierten Lichtverhältnissen (12 h hell und 12 h dunkel), bei gleichbleibender Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten. Futter- und Wasseraufnahme erfolgte nach Belieben der Tiere.

##### **4.2.4.1.1 Antigen**

Unter Antigen wird der Stoff verstanden, den das Immunsystem des Kaninchens als „fremd“ erkennt und darauf mit der Bildung von Antikörpern reagiert. Wir nutzten diesen Mechanismus, indem wir den Kaninchen [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressins (AVP)

subcutan injizierten, um später aus dem Blut der Tiere die spezifischen Antikörper zu gewinnen.

#### **4.2.4.1.2 Kopplung des Antigens mit einem Trägerprotein**

Die Kopplung an ein Trägerprotein diene zur Steigerung der Immunantwort des Kaninchens. In diesem Fall wurde [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin (AVP) mittels Carbodiimid (1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) (CDI) an das Trägerprotein Haemocyanin (KLH) gekoppelt.

10 mg Haemocyanin (KLH) wurden in 1,5 ml Aqua bidest. und 5 mg AVP in 0,5 ml Aqua bidest. gelöst und beide Lösungen miteinander 10 min bei Raumtemperatur gemischt.

5 mg Carbodiimid wurden in 1 ml Aqua bidest. gelöst und der Lösung zugesetzt. Es folgte eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur und die Lagerung über Nacht bei 4°C (12 h). Nach Zugabe von 1 ml Aqua bidest. am folgenden Tag, wurde das Konjugat auf 10 x 0,4 ml-Aliquots verteilt und bis zur Immunisierung der Kaninchen bei -20°C eingefroren.

#### **4.2.4.1.3 Immunisierung der Kaninchen**

Zur Primärimmunisierung wurden 0,4 ml des CDI-Konjugats mit 0,4 ml Freud`schem Adjuvants (komplett) vermischt und dem Kaninchen an mindestens zwei Stellen subcutan injiziert. Dieser Vorgang wurde dreimal mit jeweils einer Woche Abstand wiederholt.

Im Anschluß erfolgte die Boosterung. Hierfür wurde das CDI-Konjugat mit inkompletten Freud`schem Adjuvants gemischt und bis zu 9 mal im Abstand von vier Wochen dem Tier injiziert.

#### 4.2.4.1.4 Titerbestimmung

Zwei Wochen nach Abschluß der Primärimmunisierung bzw. nach der jeweiligen Boosterung wurde dem Kaninchen zur Antikörperbestimmung aus einer Ohrvene Blut entnommen. Dieses wurde zur Serumgewinnung zunächst 1 h bei Raumtemperatur und dann 20 h bei 4°C gelagert. Anschließend wurde das Blut bei 1000 x g 15 min zentrifugiert.

Das so gewonnene Serum wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000) im FP RIA auf Antikörper untersucht.

Wies das Kaninchen einen ausreichend hohen Antikörpertiter auf, wurde es entblutet. Die Seren mit den höchsten Antikörpertitern wurden gepoolt, aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

#### 4.2.4.2 Radioimmunoassays (RIA) für $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin(1-31), N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin(1-31) und [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin

Die Bestimmung der Peptidmengen in den stimulierten sowie in den Standardansätzen erfolgte mittels Fluid Phase Radioimmunoassays (FP RIA).

Es konnte hierbei auf eine vielfach erprobtes Verfahren zurückgegriffen werden. Die Herstellung der für dieses Nachweisverfahren benötigten Substanzen wurde in den Punkten 4.1.1.2ff. beschrieben.

##### 4.2.4.2.1 Durchführung

Das Ansetzen der Inkubationsansätze erfolgte in 1,5 ml Eppendorfgefäßen, die zuvor in Eis eingebettet wurden. Die Lösungen des Reaktionsansatzes wurden wie in Tabelle 4 beschrieben pipettiert, im Anschluß gut durchmischt und 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte die Aufgabe von 300 µl Kohlesuspension (0,1% Aktivkohle w/v, 0,5% BSA w/v in Puffer C, 4°C) auf alle Inkubationsansätze, mit Ausnahme der C<sub>T</sub>-Werte. Die Ansätze wurden im Anschluß 4 min bei 8800 x g zentrifugiert und erneut auf Eis gelagert. Aus jedem Ansatz wurden 450 µl Überstand in ein Polystyrol-

(„RIA“-) Röhrchen pipettiert. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im Gamma-Counter, die Zählzeit betrug 1 min.

#### 4.2.4.2.2 Inkubationsansatz

Der Inkubationsansatz setzte sich aus den in Tabelle 4 beschriebenen Substanzen zusammen. Das Inkubationsvolumen betrug 140 µl pro Ansatz.

	Puffer C (µl)	Puffer D (µl)	Antiserum (µl) in Puffer C	Nicht markiertes Antigen in Puffer D	( <sup>125</sup> I)markiertes Antigen (µl) in Puffer D
B <sub>0</sub> (Überstand)	50	20	100	-	20
Standard (Überstand)	50	-	100	20	20
Blank (Überstand)	100	20	-	-	20
B <sub>0</sub> (Lysat)	100	20	50	-	20
Standard (Lysat)	100	-	50	20	20
Blank (Lysat)	150	20	-	-	20
C <sub>T</sub>	500	20	-	-	20

**Tabelle 4** Inkubationsansatz zur Bestimmung von  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin(1-31), N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin(1-31) oder (Arginin<sup>8</sup>)Vasopressin in Extrakten von Zellüberständen oder Zelllysaten nach UV-Stimulation oder in Standardansätzen

#### Gesamtradioaktivität (C<sub>T</sub>-Werte):

In diesem Inkubationsansatz wurde die Gesamtmenge der eingesetzten Radioaktivität bestimmt.

**Blank-Wert ( $B_L$ ):**

Dieser Wert diente zur Bestimmung der Radioaktivität im Überstand, die nicht auf die Bindung des markierten Peptids an Komponenten des Antiserums zurückzuführen war. Auch der Geräteleerwert floß in den Blank-Wert mit ein. In der Auswertung wurden  $C_T$ -,  $B_0$ - und Standard-Wert um den  $B_L$  bereinigt.

 **$B_0$ -Wert:**

Mit diesem Wert wurde die Menge an radioaktiv markiertem Peptid bestimmt, die vom Antikörper in Abwesenheit von nicht-radioaktiv markiertem Liganden gebunden werden konnte. Dieser Wert diente der Ermittlung des unter den gegebenen Bedingungen maximalen Bindungswertes des markierten Antigens ( $[^{125}\text{I}]\beta\text{-H-Endorphin}$ ,  $[^{125}\text{I}]\text{N-Acetyl-}\beta\text{-H-Endorphin}$  oder  $[^{125}\text{I}][\text{Arginin}^8]\text{Vasopressin}$ ) an den entsprechenden Antikörper.

**Standard-Werte:**

Diese Werte dienten zur Erstellung einer Standardkurve, anhand derer die Konzentration von  $\beta\text{-H-Endorphin}(1-31)$ ,  $\text{N-Acetyl-}\beta\text{-H-Endorphin}(1-31)$  bzw.  $(\text{Arginin}^8)\text{Vasopressin}$  (je nach Experiment) in einer Probe bestimmt werden konnte. Dabei wurden steigende Mengen an nicht markiertem Peptid ( $\beta\text{-H-Endorphin}$ ,  $\text{N-Acetyl-}\beta\text{-H-Endorphin}$  bzw.  $[\text{Arginin}^8]\text{Vasopressin}$ ) den Inkubationsansätzen zugesetzt und die Radioaktivität in den entsprechenden Ansätzen bestimmt.

**4.2.4.2.3 Auswertung**

Die im FP RIA gemessene gebundene Radioaktivität (cpm) der Standardansätze wurde, ansteigender Konzentration an unmarkierten Liganden folgend, in das Statistikprogramm ORIGIN eingegeben und gezeichnet. Es ergab sich eine sigmoidal verlaufende sich asymptotisch der X-Achse nähernde Kurve. Aus dieser wurde mittels des Fit-Programms Logistic im ORIGIN eine Fit-Kurve erstellt, welche der Standardkurve entsprach. Die dabei gewonnenen Daten ( $p$ ,  $x_0$ ,  $A_1$  und  $A_2$ ) konnten in die aus der Umformung der Logistischen Gleichung erhaltene Formel, die einer sigmoidalen Funktion beschreibt, eingegeben werden.

$$y = A1 - A2 / 1 + (x / x0)^p + A2 \quad (\text{algebraisch formuliert})$$

$$\underline{(((A1 - A2) / (col < var > - A2)) - 1)^{(1 / p)} * x0} \quad (\text{ORIGIN-codiert})$$

Die Werte der in den RIAs gemessenen Radioaktivitäten (cpm) aus den Stimulationsansätzen wurden mittels an den im ORIGIN-Programm erhaltenen Standardkurven ausgewertet. Entweder geschah dies graphisch mittels eines „toolreaders“ über die Standard-Fit-Kurve selbst oder die Werte wurden arithmetisch über die Funktionsformel in Peptidmengen umgerechnet. Aus den gemessenen Doppelwerten an Radioaktivität wurden so Doppelwerte an Peptidmengen bzw. Mengen an immunoreaktivem Material bestimmt, aus denen dann Mittelwerte ( $x_{\text{mean}}$ )  $\pm$  Standardabweichung (SD) berechnet wurden.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Nachweis spezifischer, nicht zellulärer Bindungsstellen für $\beta_H$ -Endorphin in Keratinozytenzellkulturen

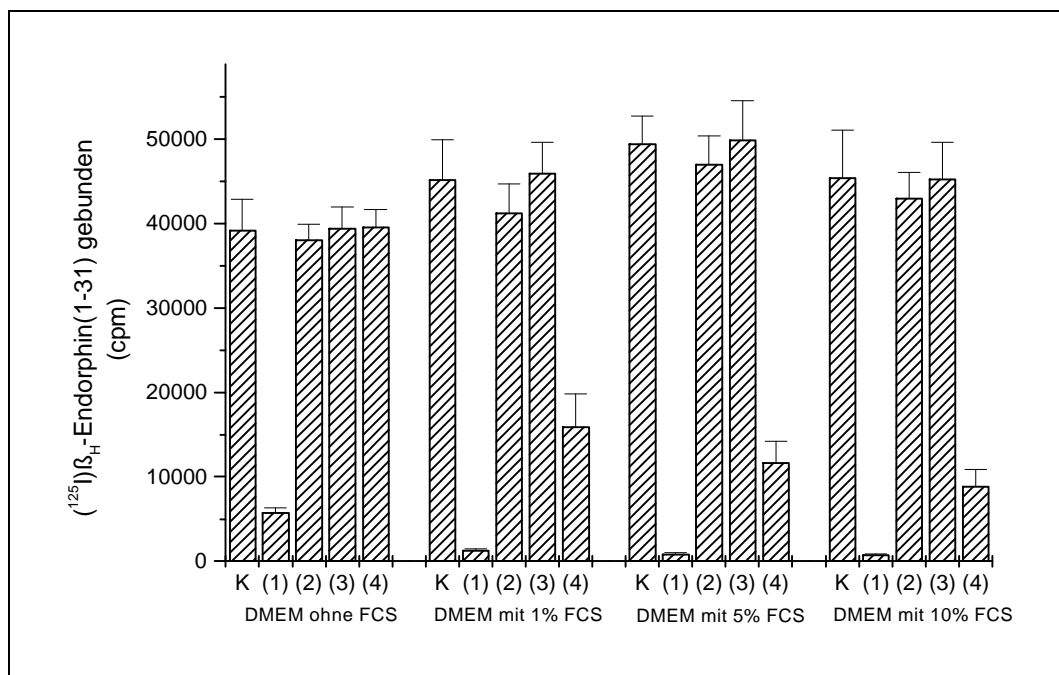
#### 5.1.1 Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an nicht identifizierte Bindungsstellen in Keratinozytenkulturen

Zur Kontrolle der Bindungsbedingungen in Keratinozytenzellkulturen wurden über zwei Tage Inkubationen unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen (s. 4.1.1.1.2.1, Ansatz 2 und 3) mit 35 mm  $\varnothing$  und 100 mm  $\varnothing$  Zellkulturschalen durchgeführt. Die Inkubate enthielten entweder nur DMEM mit sämtlichen Zusätzen außer FCS oder sie enthielten zusätzlich FCS in Konzentrationen von 1%, 5% bzw. 10%. Keines der Inkubate enthielt Keratinozyten. Nach Abschluß der Vorinkubationsphase wurden die Schalen jeweils wie im Methodenteil beschrieben (s. 4.1.2) behandelt und Bindungsversuche mit  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) in Abwesenheit oder Anwesenheit von nicht markierten  $\beta_H$ -Endorphin(1-31),  $\beta_H$ -Endorphin(18-27),  $\beta_H$ -Endorphin(1-5) und  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob das  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) spezifisch an Komponenten des Zellkulturmediums und/oder des Schalenmaterials gebunden wurde und – falls ja – mit welchem seiner Fragmente.

Das Ergebnis des DMEM-Ansatzes ohne FCS (siehe Abb.4) zeigt, daß  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) spezifisch mit seinem Fragment  $\beta_H$ -Endorphin(6-17) an die Kombination Schalenmaterial mit Zellkulturmedium (ausschließlich FCS) bindet.

Wird zusätzlich mit 1%, 5% oder 10% FCS inkubiert, wird eine mit steigender FCS-Konzentration zunehmende Bindung des  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphins über sein C-terminales Fragment sichtbar (Abb.4):  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) verdrängt den Tracer mit von 1% auf 10% steigender Konzentration zunehmend stärker. Es verbleibt jedoch eine durch  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) nicht verdrängbare Restbindung des Tracers; sie konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Die eindeutig C-terminale Bindung des  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphins an eine offensichtlich dem FCS entstammende Bindungsstelle führte zu der Vermutung, es könnte sich bei dieser Bindungsstelle um Vitronectin handeln. Jedenfalls schien die Bindungsstelle des  $\beta_H$ -Endorphin-

Fragmentes  $\beta_H$ -Endorphin(6-17) höchstwahrscheinlich an der Schale lokalisiert zu sein, da außer den Antibiotika nur niedermolekulare Verbindungen im DMEM zu finden waren. Die mit dem FCS eingebrachte Bindungsstelle des C-terminalen Fragmentes dagegen war zwar als Makromolekül offenbar auch an der Schalenwand adsorbiert, wo sie ja dann auch nachgewiesen wurde; es war jedoch damit zu rechnen, daß diese Adsorption in konfluenten Keratinozytenkulturen nicht mehr an der Schale, sondern – wenn überhaupt – an Zellen stattfinden würde.



**Abb.4** Bindung von  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) in Abwesenheit [Kontrolle K] bzw. in Gegenwart von  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) und  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmenten [ $4 \times 10^{-6}$  M] in 35 mm Ø Zellkulturschalen ( die Ergebnisse mit 100 mm Ø Zellkulturschalen waren nahezu identisch) nach 2 tägiger Inkubation mit DMEM entweder ohne oder mit FCS in steigenden Konzentrationen.  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

(1):  $\beta_H$ -Endorphin(1-31)

(2):  $\beta_H$ -Endorphin(18-27)

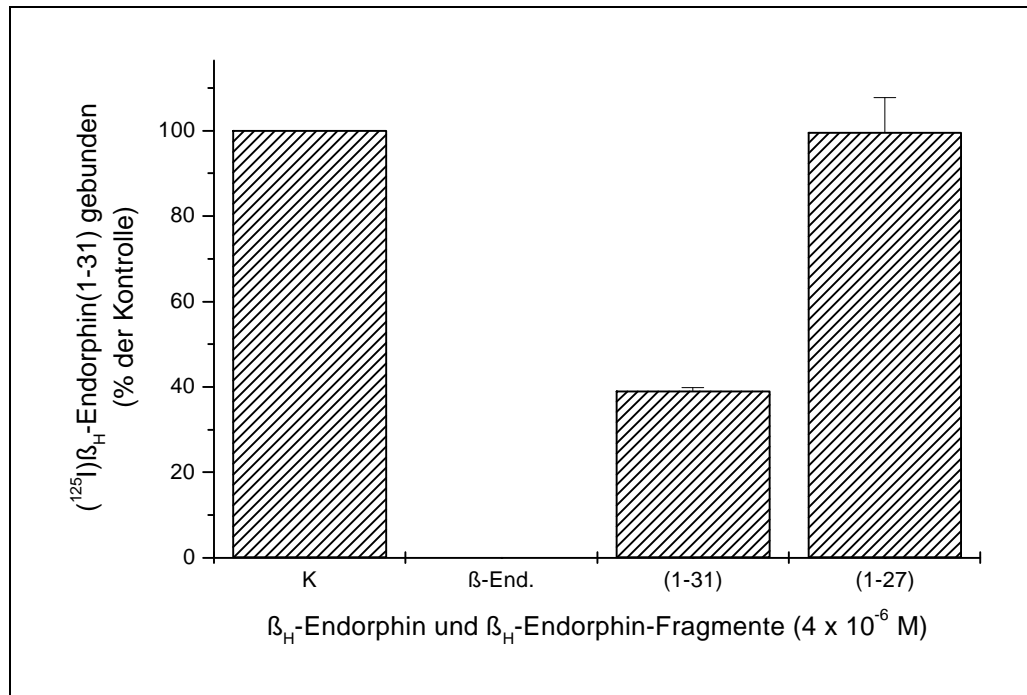
(3):  $\beta_H$ -Endorphin(1-5)

(4):  $\beta_H$ -Endorphin(27-31)

### 5.1.2 Nachweis der Charakteristika einer $\beta_H$ -Endorphin/Vitronektin-Interaktion

Die Keratinozytenzellkulturen, die wie unter 4.1.1.1.2 beschrieben, angesetzt wurden, wurden mit der unter 4.1.2.1 beschriebenen Methodik nach spezifischen Bindungsstellen für  $\beta_H$ -Endorphin gesucht. Den unter 5.1.1 beschriebenen Ergebnissen zufolge wären zwei Bindungsstellen zu erwarten gewesen, an die das ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin über das C-terminale Fragment bzw. das  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment  $\beta_H$ -Endorphin(6-17) binden konnte. Es war allerdings auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die das in Keratinozytenzellkulturen  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment(6-17)-bindende Bindungsstelle auf der Schale von den Keratinozyten abgedeckt werden und dem radioaktiv markierten Liganden somit nicht mehr zur Verfügung stehen würde. Die C-terminale Bindungsstelle dagegen war offenbar mit dem FCS in die Schale eingebracht worden und sollte erwartungsgemäß dem radioaktiv markierten Liganden zugänglich sein, da das FCS auch der Keratinozytenzellkultur mit den Medien zugesetzt wurde. In der Tat wurde eine C-terminale Bindungsstelle in der Keratinozytenzellkultur gefunden (Abb.5); in diesem Vorversuch wurde das ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin zwar von  $\beta_H$ -Endorphin(1-31), aber nicht durch das  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment  $\beta_H$ -Endorphin(1-27) verdrängt. Diese Bindungsstelle könnte jedoch nicht nur mit dem FCS eingebracht, sondern auch von den Keratinozyten selbst exprimiert worden sein. Da jedenfalls die bereits bekannte Bindung des  $\beta_H$ -Endorphins an Vitronektin über das C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment erfolgt, wurde die in der Keratinozytenkultur gefundene C-terminale Bindungsstelle auf ihre Identität mit der Vitronektin-Bindungsstelle geprüft.

Dazu wurden die von Burt (1978) klassifizierten Bindungscharakteristika bestimmt. Damit erhofften wir unsere Hypothese, daß die Bindung von  $\beta_H$ -Endorphin tatsächlich an Vitronektin erfolgte, zu erhärten. Die Bindungscharakteristika werden in den folgenden Punkten dargestellt.

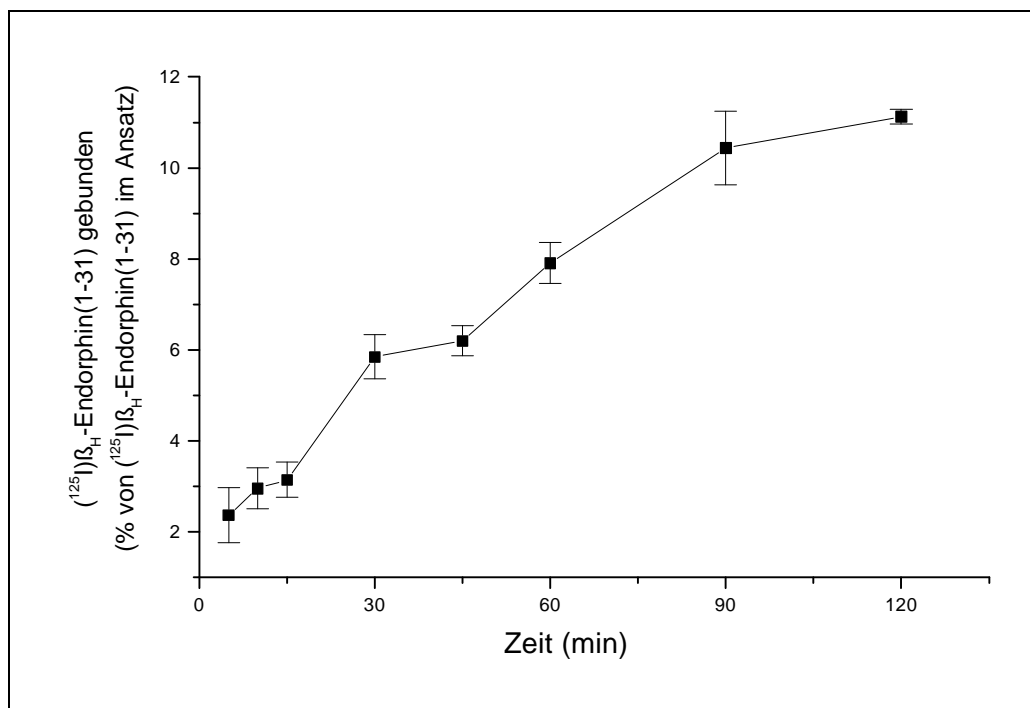


**Abb.5** Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) in Abwesenheit [Kontrolle K] bzw. in Gegenwart von β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) oder von β<sub>H</sub>-Endorphin-Fragmenten (4 x 10<sup>-6</sup> M) in Keratinozyten-Zellkulturen (Zelllinie HaCaT; 100% Konfluenz; 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/Schale). Das Kulturmedium enthielt 10% FCS.  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 1 Versuch.

### 5.1.2.1 Zeitabhängigkeit

(<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) wurde mit Keratinozytenkulturen, die FCS in einer Konzentration von 10% enthielten, bei 0°C inkubiert und die Assoziation des Tracers an den Binder in entsprechenden Ansätzen zu den angegebenen Zeitpunkten beendet. Nach ca. einer Stunde war die Hälfte der Bindungsstellen durch den Radioliganden besetzt und nach zwei Stunden konnte keine wesentliche Zunahme der Bindung mehr beobachtet werden. Für die weiteren Versuche wurde, aufgrund dieser Ergebnisse, eine Inkubationszeit von zwei Stunden gewählt.

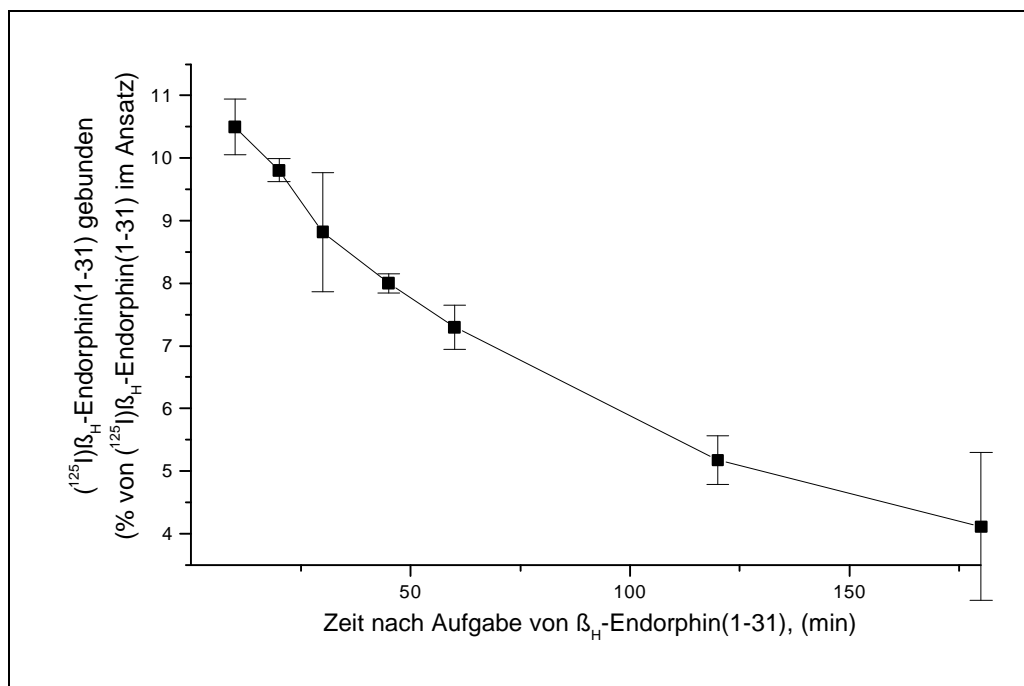
Die Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin erwies sich somit als zeitabhängiger Prozeß.



**Abb.6** Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin in Abhängigkeit von der Zeit in Keratinozyten-Zellkulturen (Zelllinie HaCaT; 100% Konfluenz; 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/Schale). Das Zellkulturmedium enthielt 10% FCS.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 3 Versuchen.

### 5.1.2.2 Reversibilität

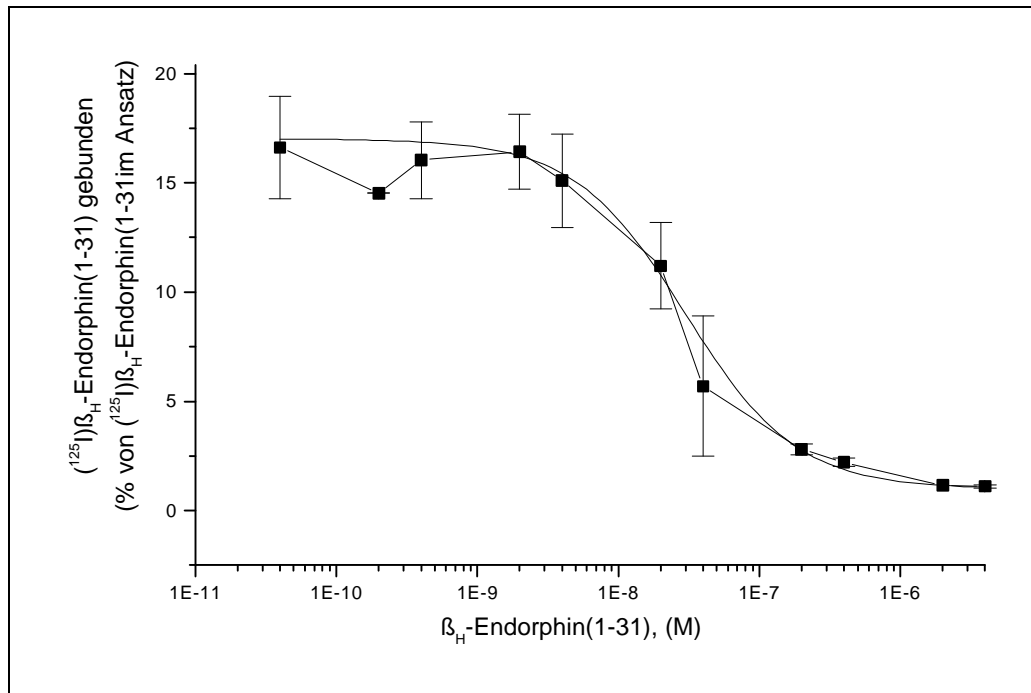
Der Nachweis der Reversibilität erfolgte durch Verdrängung des zuvor gebundenen (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphins durch den unmarkierten Liganden β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) in einer Konzentration von 4 x 10<sup>-6</sup> M. In Abb. 7 ist die Verdrängung des markierten Liganden durch den unmarkierten im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin erwies sich als reversibel.



**Abb.7** Verdrängung des gebundenen  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphins durch  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) ( $4 \times 10^{-6}$  M) in Keratinozyten-Zellkulturen (Zelllinie HaCaT; 100% Konfluenz;  $1,5 \times 10^6$  Zellen/Schale). Das Kulturmedium enthielt 10% FCS.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

### 5.1.2.3 Sättigbarkeit

Die Sättigbarkeit der  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin-Bindung konnte in Sättigungsexperimenten mit Einsatz von nicht radioaktiv markiertem  $\beta_H$ -Endorphin in steigenden Konzentrationen nachgewiesen werden. Da spezifische Bindungsstellen nur in endlicher Zahl vorhanden waren, nahm mit steigenden Konzentrationen des unmarkierten Liganden der Anteil des Radioliganden an der Gesamtmenge der gebundenen Substanz ab. Die Sättigungskurve zeigt in semilogarithmischer Darstellung die typische sigmoidale Form (Abb.8). Die maximale Bindung des Tracers von ca. 17% wurde im  $\beta_H$ -Endorphin-Konzentrationsbereich von  $< 5 \times 10^{-10}$  M gemessen. Im Konzentrationsbereich  $1 \times 10^{-8}$  bis  $5 \times 10^{-8}$  M befand sich der steilste Verlauf der Kurve, in dem bereits geringe Konzentrationsänderungen des Liganden zu großen Veränderungen in der Bindung führten.



**Abb.8** Bindung von ( $^{125}$ I) $\beta_H$ -Endorphin(1-31) in Gegenwart von steigenden Konzentrationen von  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) ( $4 \times 10^{-11}$  bis  $4 \times 10^{-6}$  M) in Keratinozyten-Zellkulturen (Zelllinie HaCaT; 100% Konfluenz;  $1,5 \times 10^6$  Zellen/Schale). Das Kulturmedium enthielt 10% FCS.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 3 Versuchen.

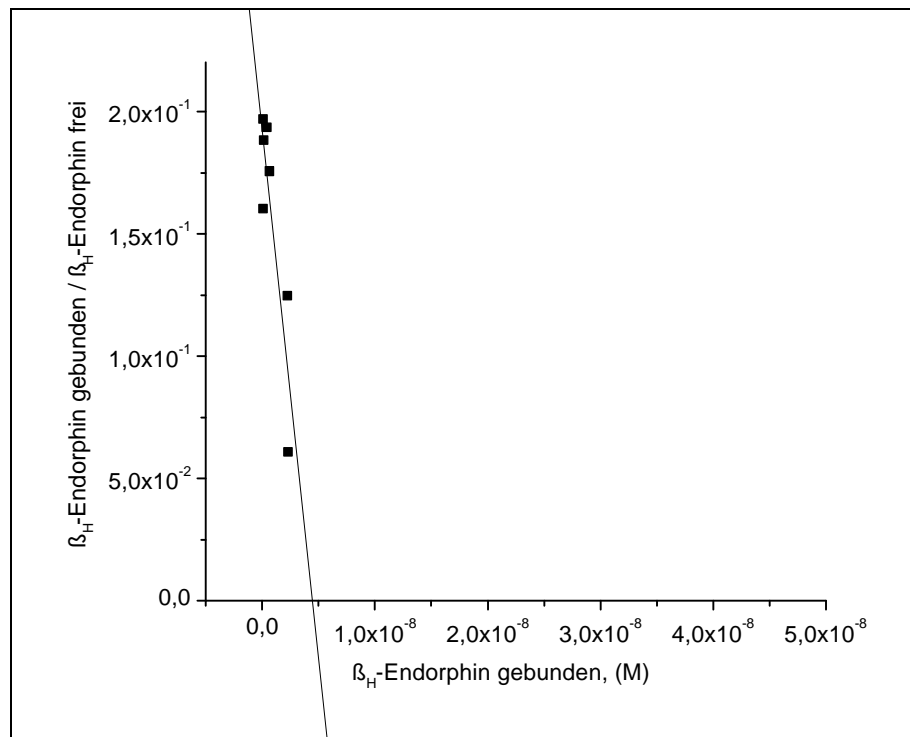
#### 5.1.2.4 Bindungsparameter $K_D$ und $B_{\text{Max}}$

Die Bindungsparameter  $K_D$  (Dissoziationskonstante) und  $B_{\text{Max}}$  (Konzentration der Bindungsstellen im Probenansatz) der Interaktion des  $\beta_H$ -Endorphins mit der C-terminalen Bindungsstelle wurden durch Analyse der unter 5.1.2.3 beschriebenen Daten mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND ermittelt. Es handelt sich hierbei um ein iteratives Kurvenanpassungsprogramm, bei dem die Bindungsparameter auf der Basis eines molekularkinetischen Modells errechnet werden. Das LIGAND-Computerprogramm erlaubt die gleichzeitige Auswertung mehrerer Bindungsexperimente, da inter-experimentelle Schwankungen durch Korrekturfaktoren ausgeglichen werden können.

Die  $K_D$  wurde mit  $2,32 \times 10^{-8}$  M und die  $B_{\text{Max}}$  mit  $4,46 \times 10^{-9}$  M berechnet.

Die konventionelle graphische Scatchard-Analyse, mittels der anhand transformierter Bindungsdaten aus den unter 5.1.2.3 dargestellten Konkurrenzexperimenten die

Bindungsparameter  $K_D$  und  $B_{MAX}$  graphisch ermittelt wurden, bestätigte im wesentlichen die mittels LIGAND berechneten Daten (Abb.9).



**Abb.9** Scatchard-Diagramm und Bindungsparameter  $K_D$  und  $B_{Max}$  aus den unter 5.1.2.3 dargestellten Bindungsdaten.

#### 5.1.2.5 Strukturspezifität

Für den Nachweis der Strukturspezifität wurde die Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin in der Zellkultur in Gegenwart einer Vielzahl von β<sub>H</sub>-Endorphin-Fragmenten gemessen. Es zeigte sich eine Bindung im Ansatz ohne Verdränger (Kontrolle K), die 20% des eingesetzten (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphins entsprach. Die Ergebnisse wiesen auf eine über den C-Terminus vermittelte Non-Opioid-Bindung hin (Abb.10). Die stärkste Hemmung der Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin erfolgte durch das vollständige Opioidpeptid, β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31). Die Bindung des Radioliganden wurde auf ca. 5% reduziert. Mit Verkürzung des Opioids nahm auch die Potenz der Verdränger ab: β<sub>H</sub>-Endorphin(18-31) reduzierte die Bindung des Radioliganden auf ca. 8%, β<sub>H</sub>-Endorphin(27-31) auf ca. 22%, β<sub>H</sub>-Endorphin(28-31) auf ca. 45%, β<sub>H</sub>-Endorphin(29-



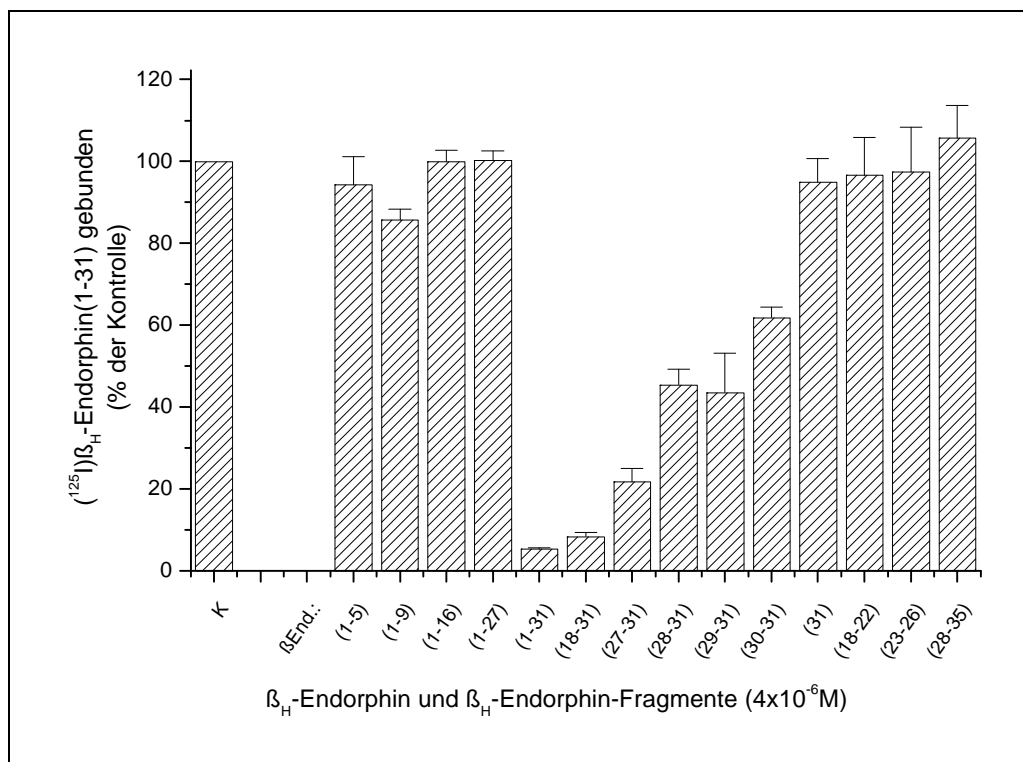
31) auf ca. 44% und  $\beta_H$ -Endorphin(30-31) auf ca. 62%.  $\beta_H$ -Endorphin(31), die Aminosäure Glutamat, vermochte nur noch geringfügig auf die Bindung von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin Einfluß zu nehmen. Deutlich erkennbar war somit die Hemmung der ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin-Bindung durch die C-terminalen Fragmente; auffällig war dabei der starke Einfluß der zwei letzten Aminosäuren,  $\beta_H$ -Endorphin(30-31). N-terminale Fragmente beeinträchtigten die ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin-Bindung nicht.

Des weiteren fiel ein Rest von ca.10% Bindung des  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmentes  $\beta_H$ -Endorphin(5-9) auf, der aber nach Verdrängung durch  $\beta_H$ -Endorphin(1-27) nicht mehr nachweisbar war.

Mit Verlängerung des C-Terminus war keine Bindung mehr möglich. Das  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment (28-35) vermochte keinen Einfluß auf die Bindung des Radioliganden zu nehmen. Dieses Phänomen wurde schon von Hildebrand et al. beschrieben (*Hildebrand et al., 1989*) und in Experimenten von Wöhner (1998) berücksichtigt.

Überhaupt zeigten die Ergebnisse weitgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Untersuchungen zur  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Vitronectin von Hildebrand et al. (1989) und Wöhner (1998) auf. Beide Autoren beschrieben eine über den C-Terminus des Opioids vermittelte Non-Opioid-Bindung an Vitronectin. Ebenso wurde die wachsende verdrängende Potenz der  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmente mit Ausdehnung des Fragmentes vom C- in Richtung des N-Terminus beschrieben (*Wöhner, 1998*).

Die nahezu identische Strukturspezifität der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung in der Keratinozytenkultur und der von Wöhner beschriebenen  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Oberflächen-assoziiertes Vitronectin (*Wöhner, 1998*) ließ annehmen, daß in den hier beschriebenen Versuchen  $\beta_H$ -Endorphin an in der Keratinozytenzellkultur vorliegendes Vitronectin gebunden hatte. Deshalb wurde versucht, Vitronectin in den hier eingesetzten Keratinozytenkulturen fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen (s. 5.1.3).



**Abb.10** Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) in Abwesenheit [Kontrolle K] bzw. in Gegenwart von β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) oder von β<sub>H</sub>-Endorphin-Fragmenten (4 x 10<sup>-6</sup> M) in Keratinozyten-Zellkulturen (Zelllinie HaCaT; 100% Konfluenz; 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/Schale). Das Kulturmedium enthielt 10% FCS. Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin in Abwesenheit von Verdrängern: ca. 20% des (<sup>125</sup>I) β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) im Ansatz.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 3 bis 4 Versuchen.

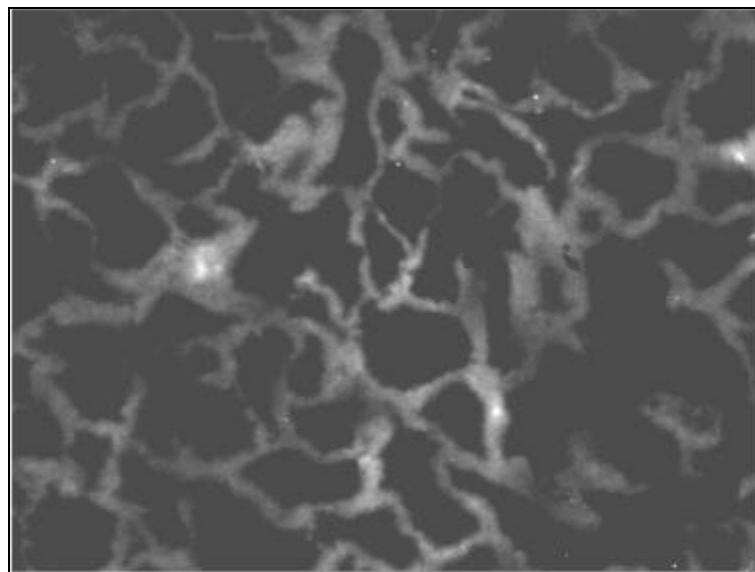
### 5.1.3 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Vitronektin

Um die Hypothese zu prüfen, Vitronektin sei der Binder für β<sub>H</sub>-Endorphin in der Keratinozytenkultur HaCaT, mußte der Versuch gemacht werden die Existenz des Vitronektins in der Keratinozytenkultur nachzuweisen. Dies sollte mit immunfluoreszenzmikroskopischer Methodik erfolgen, wobei Antikörper gegen Vitronektin eingesetzt wurden, die dann wiederum mit Fluoreszenz-markierten Gegenantikörpern lokalisiert wurden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11-12 gezeigt.

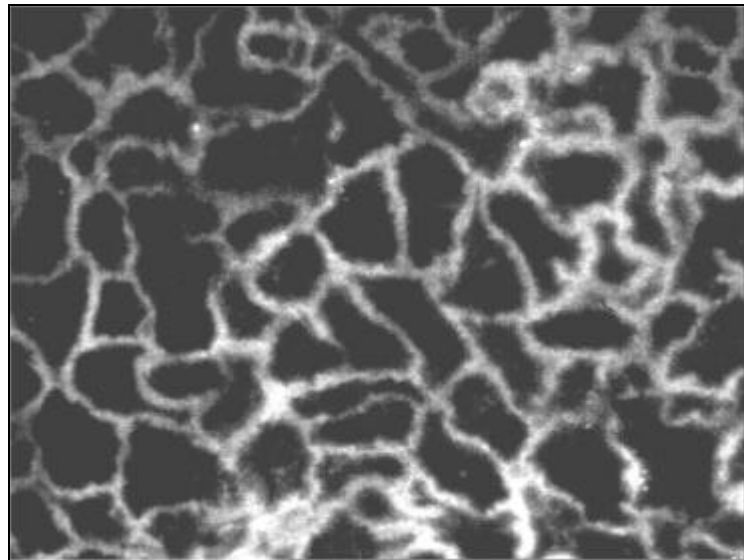
Auf Abb.11 ist deutlich die Fluoreszenzmarkierung der Vitroektinverteilung zu erkennen. Vitronektin befand sich demnach tatsächlich in der Zellkultur. Die Anordnung der Signale an der Zelloberfläche ist mit einer Lokalisation des

Vitronektins in der Extrazellulären Matrix der Zellen kompatibel. Innerhalb der Zellen sind keine Signale erkennbar.

Abb.12 zeigt die Ergebnisse von Versuchen mit permeabilisierten Zellen. Diese Abbildung ist nahezu identisch mit der vorhergegangenen. Deutlich zu erkennen sind die fluoreszierenden Signale, welche die Zellen wie einen Mantel umgeben. Wieder sind keine Signale innerhalb der Zellen sichtbar. Es scheint demnach keine Internalisierung des Vitronektins erfolgt zu sein. Vitronektin war scheinbar nur in der Extrazellulären Matrix der Zellen vorhanden.



**Abb.11** Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Vitronektin in Keratinozytenzellkulturen der Zelllinie HaCaT (100% Konfluenz;  $1,5 \times 10^6$  Zellen/Schale). Das Kulturmedium enthielt 10% FCS. (40fache Vergrößerung)



**Abb.12** Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Vitronektin in Keratinozytenzellkulturen der Zelllinie HaCaT. Die Zellen wurden im Zuge der histobiochemischen Aufbereitung permeabilisiert. Die Zellen wuchsen zur 100%igen Konfluenz heran ( $1,5 \times 10^6$  Zellen/Schale). Das Kulturmedium enthielt 10% FCS. (40fache Vergrößerung)

## **5.2 Nachweis spezifischer Bindungsstellen für $\beta_H$ -Endorphin auf adhärennten Keratinozyten in Keratinozytenzellkulturen**

Zur Sondierung weiterer  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen in der Keratinozytenkultur HaCaT erfolgte der Versuch unter Ausschluß der Bindung an Vitronektin, Bindungsstellen für  $\beta_H$ -Endorphin auf der Zelle nachzuweisen. Um Aussagen über die Bindung von  $\beta_H$ -Endorphin an die Zelle machen zu können, war es erforderlich die C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung in der Zellkultur zu blockieren.

Des weiteren wurde dem Kulturmedium für diese Versuchsreihe FCS nur noch in einer Konzentration von 1% (anstatt 10%) zugesetzt, um die Konzentration von Vitronektin im Versuchsansatz zu minimieren.

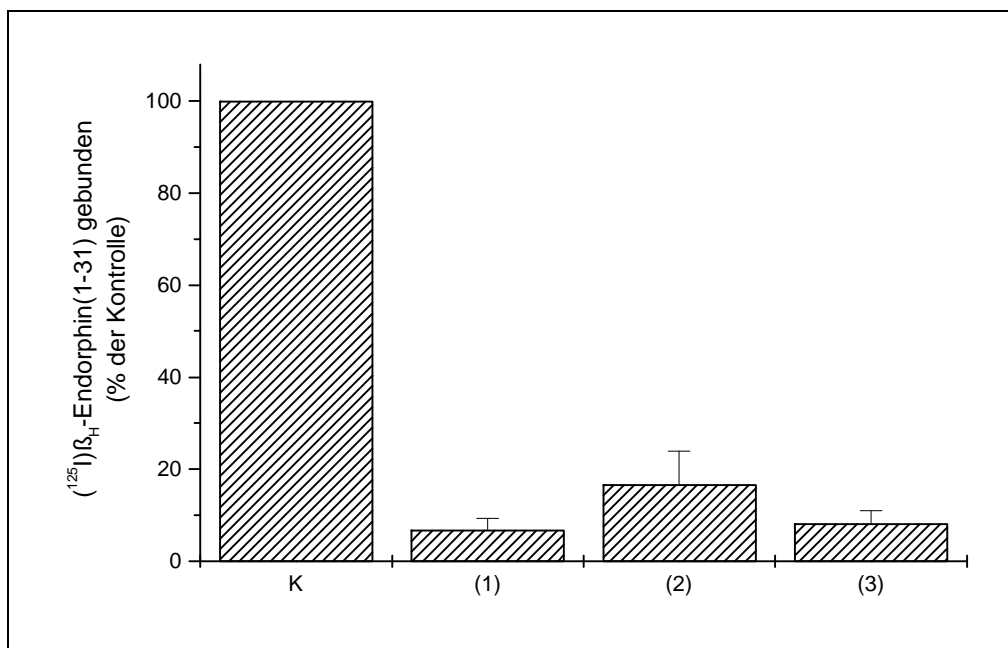
### 5.2.1 Vorversuche

In Vorversuchen wurde überprüft, ob neben der nachgewiesenen C-terminalen Bindungsstelle weitere Bindungsstellen für das Opioidpeptid in den Keratinozyten-Zellkulturen existierten. In der Kontrolle (K) wurde die Bindung des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) in Abwesenheit von Verdrängern gemessen (Abb. 13). Dieser Wert diente als Bezugswert für die Ansätze mit Verdrängern (Ansätze 1-3).

In Ansatz 1 wurde  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin (1-31),  $10^{-4}$  M, als Verdränger eingesetzt, in Ansatz 2 das C-terminale Fragment,  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(27-31),  $10^{-2}$  M, und in Ansatz 3 erfolgte der kombinierte Einsatz beider Verdränger. Die Verdränger wurden jeweils in Konzentrationen eingesetzt, in denen eine vollständige Absättigung der Bindungsstelle erfolgte.

Die vollständige Absättigung aller möglichen Bindungsstellen in der Keratinozytenkultur durch  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) zeigt Abb.8 (sogar für eine FCS-Konzentration von 10%), die vollständige Absättigung der C-terminalen Bindungsstelle durch  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(27-31) wird in Abb.14 gezeigt.  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) verdrängte am deutlichsten den Radioliganden von seinen Bindungsstellen (Abb.13). In Ansatz 1 verblieb eine ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Restbindung von ca. 6,8 ( $\pm 2,6$  SD)%. Das C-terminale Fragment zeigte sich weniger potent, es verblieben 16,8 ( $\pm 7,2$  SD)% Restbindung (Ansatz 2). Beide Verdränger in Kombination eingesetzt reduzierten die Bindung des Radioliganden auf 8, 2 ( $\pm 2,8$  SD)% (Ansatz 3).

Die verbleibende Differenz zwischen Ansatz 1 und Ansatz 2 betrug ca. 9%. Diese Differenz zwischen der maximalen Verdrängung durch das C-terminalen Fragment und durch  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin ließ die Existenz weiterer  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindungsstellen in der Zellkultur vermuten.



**Abb.13** (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31)-Bindung in Abwesenheit [Kontrolle K] und Gegenwart von β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) ( $4,8 \times 10^{-6}$  M), des C-terminalen β<sub>H</sub>-Endorphin-Fragments (27-31) ( $4,8 \times 10^{-4}$  M) oder von beiden Verbindungen an Keratinozyten (HaCaT; 100% Konfluenz;  $8 \times 10^6$  Zellen/Schale). Das Kulturmedium enthielt 1% FCS. (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindung in Abwesenheit von Verdrängern: ca. 7% des (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphins (1-31) im Ansatz.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

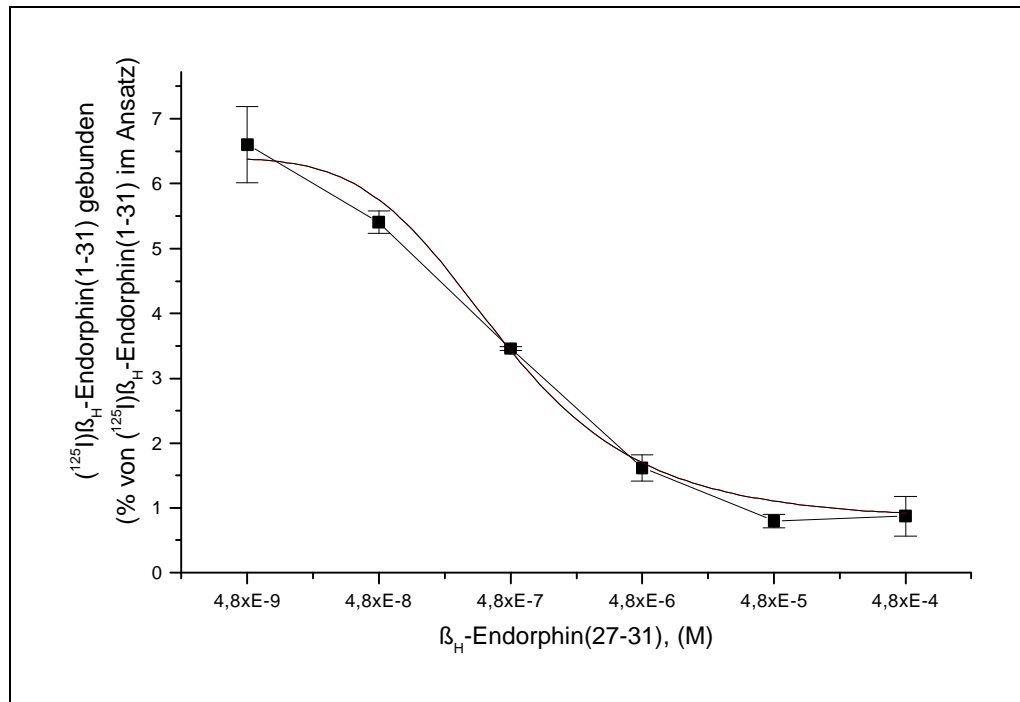
[1]: β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) ( $4,8 \times 10^{-6}$  M)

[2]: β<sub>H</sub>-Endorphin(27-31) ( $4,8 \times 10^{-4}$  M)

[3]: β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) ( $4,8 \times 10^{-6}$  M) + β<sub>H</sub>-Endorphin-Fragment (27-31) ( $4,8 \times 10^{-4}$  M)

### 5.2.2 Blockade der β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindungsstelle auf Vitronektin

Abbildung 14 zeigt den typischen sigmoidalen Verlauf einer Sättigungskurve. Der Anteil des Radioliganden an der Gesamtbindung nahm mit steigenden Konzentrationen von β<sub>H</sub>-Endorphin(27-31) ab. β<sub>H</sub>-Endorphin(27-31) zeigte in Konzentrationen  $> 4,8 \times 10^{-5}$  M keine weitere Verdrängung, die spezifischen C-terminalen Bindungsstellen schienen abgesättigt zu sein. In den folgenden Versuchen wurde deshalb zur Blockade der C-terminalen β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindungsstelle β<sub>H</sub>-Endorphin(27-31) in einer Konzentration von  $4,8 \times 10^{-4}$  M eingesetzt.



**Abb.14** Bindung von  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) in Anwesenheit des C-terminalen  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmentes (27-31) in ansteigenden Konzentrationen ( $4,8 \times 10^{-9}$  bis  $4,8 \times 10^{-4}$  M) in Keratinozyten-Zellkultur (HaCaT; 100% Konfluenz;  $8 \times 10^6$  Zellen/Schale). Das Kulturmedium enthielt 1% FCS. Bindung des  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin in Abwesenheit von Verdrängern: ca. 7% des  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphins(1-31) im Ansatz.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

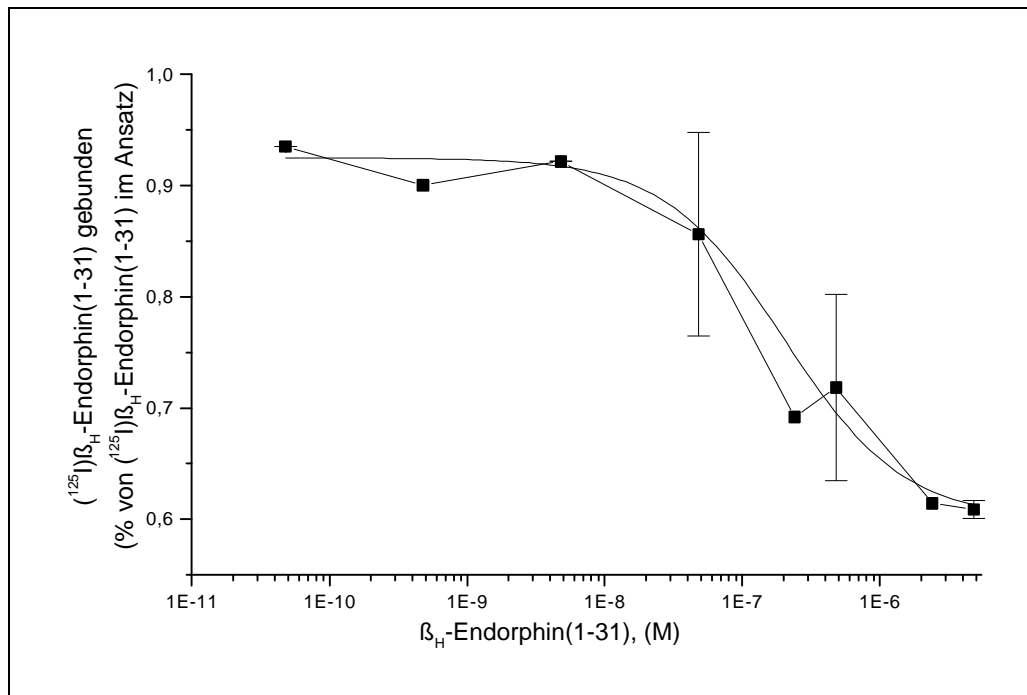
### 5.2.3 Charakteristika der Bindung

Nach Absättigung der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle auf Vitronectin in der Keratinozytenkultur erfolgte die Charakterisierung der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten.

#### 5.2.3.1 Sättigbarkeit

Zum Nachweis der Sättigbarkeit der  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten wurde das unmarkierte  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) in ansteigenden Konzentrationen den Ansätzen zugesetzt. Mit steigenden Konzentrationen des unmarkierten Liganden

nahm der Anteil an gebundenem ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin immer mehr ab. Mit Einsatz von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Konzentrationen von  $> 4,8 \times 10^{-6} \text{ M}$  erfolgte keine weitere Verdrängung des Radioliganden. Abbildung 15 zeigt den typisch sigmoidalen Verlauf der Sättigungskurve. Die  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindungsstellen schienen bei einer Konzentration von  $4,8 \times 10^{-6} \text{ M}$  abgesättigt zu sein.



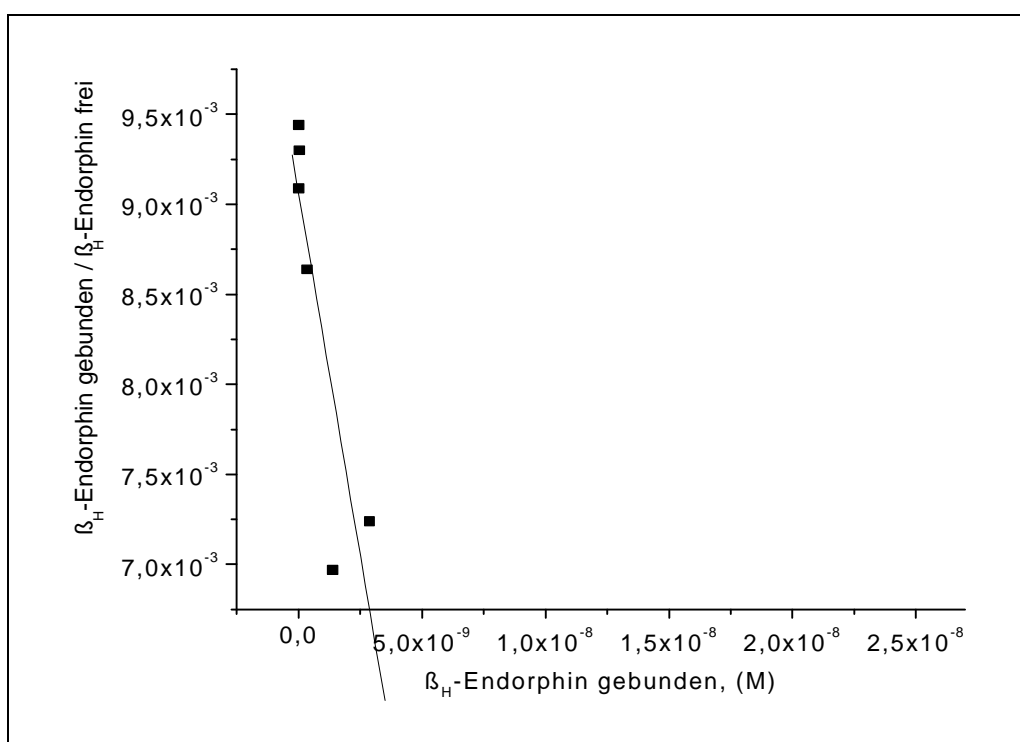
**Abb.15** Spezifische Bindung von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) in Gegenwart von steigenden  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31)-Konzentrationen ( $4,8 \times 10^{-11}$  bis  $4,8 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) in Keratinozyten-Zellkulturen (HaCaT 100% Konfluenz;  $8 \times 10^6$  Zellen/Ansatz). Bindung des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphins nach Absättigung der C-terminalen Bindungsstelle durch  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(27-31) in Abwesenheit von Verdrängern: 1% des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphins (1-31) im Ansatz. Das Kulturmedium enthielt 1% FCS.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

### 5.2.3.2 Bindungsparameter $K_{\text{D}}$ und $B_{\text{MAX}}$

Die Ermittlung der Bindungsparameter  $K_{\text{D}}$  und  $B_{\text{MAX}}$  erfolgte durch Analyse der unter 5.2.3.1 dargestellten Sättigungsexperimente mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND.



Es wurden zwei Dissoziationskonstanten berechnet ( $K_{D1}=2,7 \times 10^{-7}$  M und  $K_{D2}=2,1 \times 10^{-5}$  M). Die Konzentration der Bindungsstellen/Ansatz betrug  $6,3 \times 10^{-8}$  M. Die beiden  $K_D$ -Werte wiesen auf die Existenz von zwei niederaffinen Bindungsstellen hin. Die Bindungsparameter wurden zur Überprüfung auch graphisch ermittelt. Hierbei ergab sich nur eine Dissoziationskonstante, deren Wert zwischen den beiden im LIGAND-Programm ermittelten lag ( $K_D=1,24 \times 10^{-6}$  M). Die Konzentration der Bindungsstellen differierte kaum.

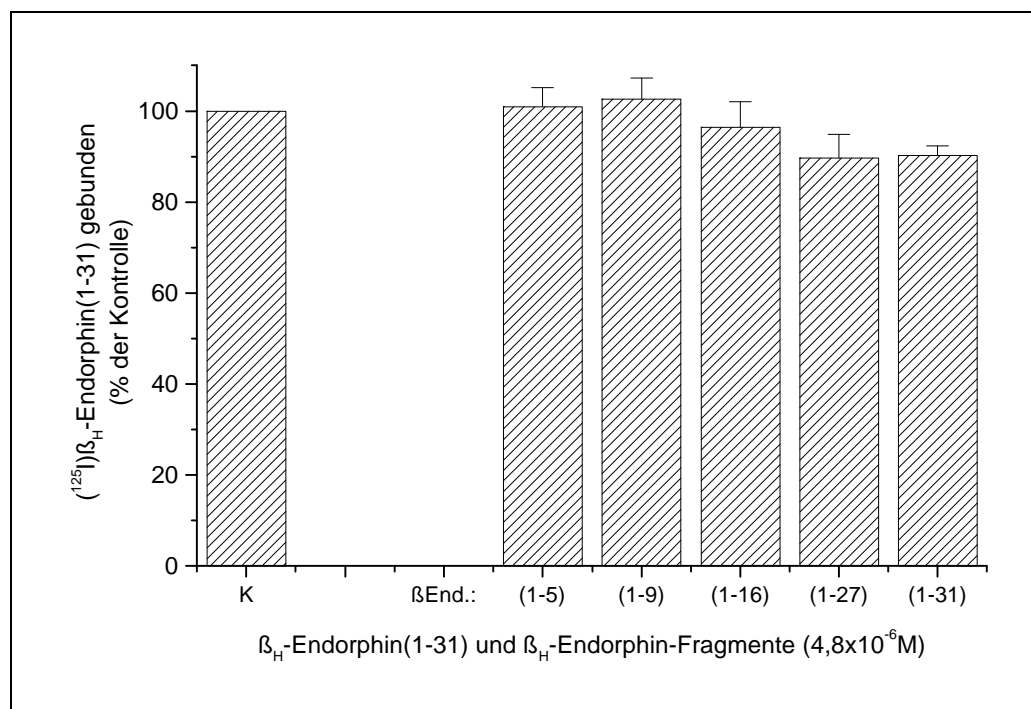


**Abb.16** Scatchard-Diagramm und Bindungsparameter  $K_D$  und  $B_{Max}$  aus den unter 5.2.3.1 dargestellten Bindungsdaten.

### 5.2.3.3 Strukturspezifität

Für den Nachweis der Strukturspezifität wurde unter Abdeckung der C-terminalen Bindungsstelle durch  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) die Bindung von  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin(1-31) in Gegenwart verschiedener  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmente gemessen (Abb.17). Die Bindung von  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin ohne Inhibitor, dargestellt in der Kontrolle K, betrug ca. 1% des  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphins (1-31) im Ansatz. Es erfolgte keine Hemmung der

$(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ -Bindung durch die N-terminalen  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ -Fragmente,  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-5)$  und  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-9)$ . Es konnte eine Reduktion der Bindung des Radioliganden durch  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$ , bezogen auf die Kontrolle K, auf  $90,24 (\pm 2,08 \text{ SD})\%$  und durch  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-27)$  auf  $89,68 (\pm 5,17 \text{ SD})\%$  gemessen werden. Die Hemmung der Bindung von  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$  durch das  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ -Fragment  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-27)$  ließ auf eine Bindung des  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphins}$  an die somit nachgewiesene Bindungsstelle über sein Mittelfragment schließen.



**Abb.17** Bindung von  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$  in Abwesenheit [Kontrolle K] oder in Gegenwart von  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$  bzw.  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$ -Fragmenten in Keratinozyten-Zellkulturen (HaCaT; 100% Konfluenz;  $8 \times 10^6$  Zellen/Schale). Im Kulturmedium befand sich 1% FCS. Bindung des  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphins}$  nach Absättigung der C-terminalen Bindungsstelle in Abwesenheit von Verdrängern: ca. 1% des  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphins}$  (1-31) im Ansatz.  $x_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

### **5.3 Nachweis spezifischer Bindungsstellen für $\beta_H$ -Endorphin auf Keratinozyten in Suspension**

Um mit einem Höchstmaß an Sicherheit eine  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an die Zellkulturschale oder an Bestandteile des Kulturmediums (FCS) ausschließen zu können, wurden schließlich noch Bindungsversuche an Keratinozyten der Zelllinie HaCaT durchgeführt, die aus der Zellkultur in eine Zellsuspension überführt worden waren.

#### **5.3.1 Optimierung der Versuchsdurchführung**

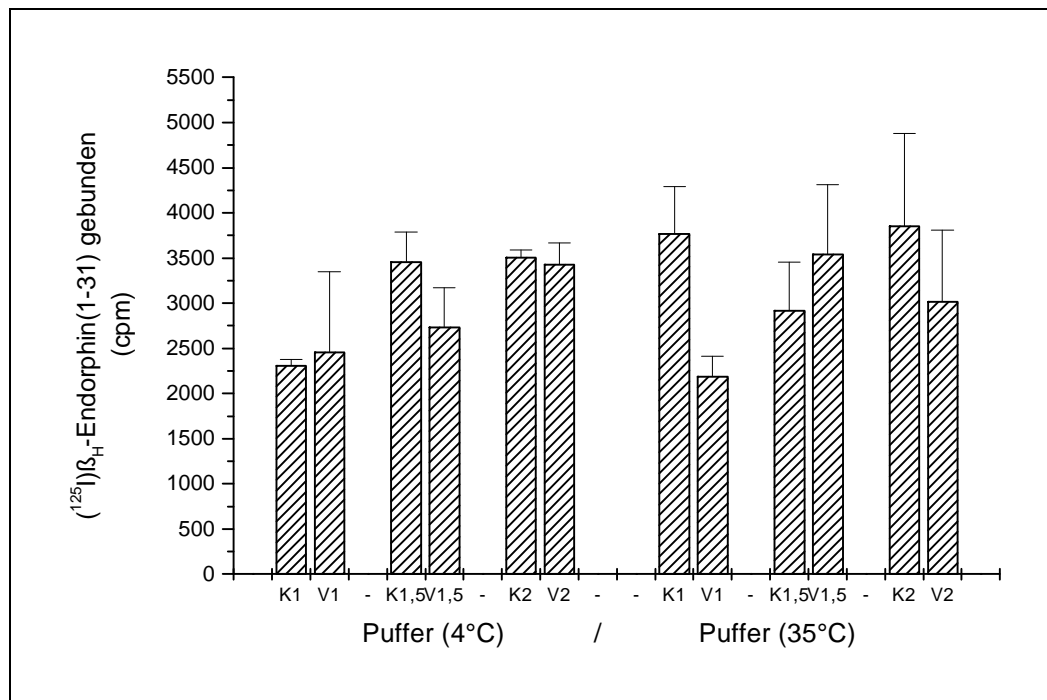
Um die Versuche für die Zellen unter möglichst schonenden Bedingungen durchzuführen, wurden einige Versuche zur Optimierung der Versuchsmethode unternommen.

##### **5.3.1.1 Zellpräparation**

Das Herauslösen aus dem Zellverband stellte für die Zellen eine enorme Beanspruchung dar. Um diesen Vorgang so schonend wie möglich durchführen zu können, wurde die Puffertemperatur während des ersten Waschgangs und die Ablösezeit der Zellen mit Trypsin-Lösung variiert, um auf diese Weise die optimale Puffertemperatur und Ablösezeit zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Es wurde kalter Puffer (4°C) mit warmem Puffer (37°C) sowie die Ablösezeiten 60, 90 und 120 min miteinander verglichen. Wie aus Abbildung 18 zu entnehmen, konnten aufgrund der hohen Streuung der Ergebnisse nur eingeschränkt Erkenntnisse aus diesem Versuch gewonnen werden. Puffertemperatur und Ablösezeit schienen keinen wesentlichen Einfluß auf die Bindung von  $\beta_H$ -Endorphin an die Zellen zu nehmen. In den folgenden Versuchen wurden warme Pufferlösungen von ca. 37°C verwendet.

Nach maximal 30 min Inkubation mit Trypsin-Lösung im Brutschrank bei 37°C hatten sich die Zellen vom Schalenboden gelöst. Um die Zellen möglichst kurz der

wahrscheinlich schädigenden Wirkung von Trypsin auszusetzen und unter Berücksichtigung der in Abbildung 19 gezeigten Ergebnisse, wurde die Inkubationszeit deshalb auf ca. 30 min. (bis zur vollständigen Ablösung der Zellen) festgelegt.



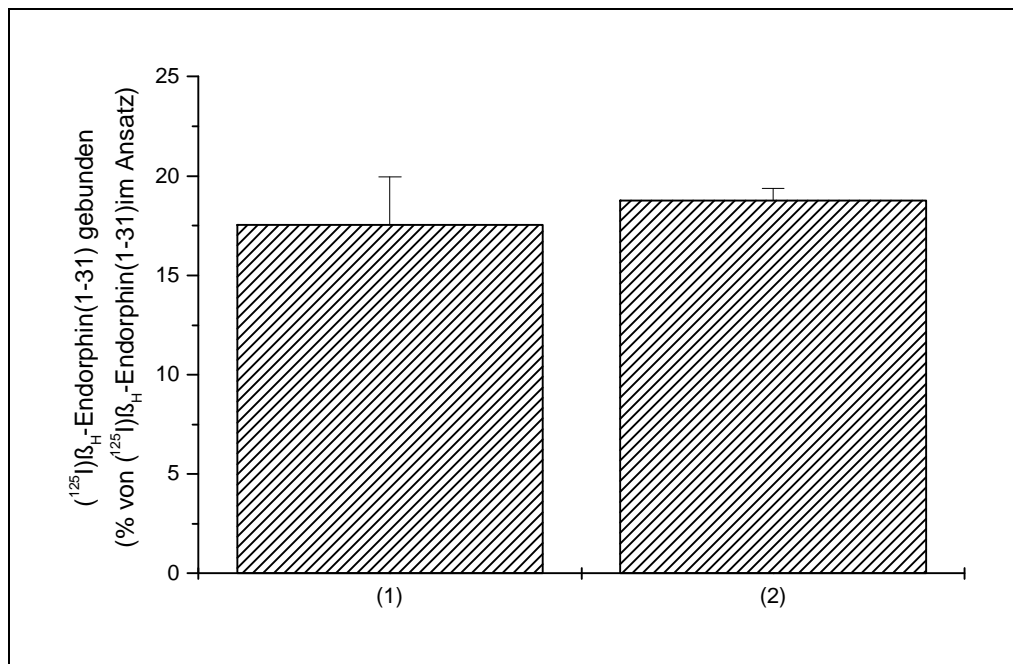
**Abb.18** Bindung von  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$  in Abwesenheit [Kontrolle K] und Gegenwart von  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}(1-31)$  ( $10^{-5}$  M) an Keratinozyten (HaCaT;  $11 \times 10^6$  Zellen/ml) in Suspension in Abhängigkeit von Ablösezeit (1,0; 1,5 und 2,0 h) und Puffertemperatur (4 und 35°C).  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Doppelbestimmungen eines Versuchs.

K: Kontrolle

V: Verdränger

In einem weiteren Versuch wurde die Ablösung der Zellen mittels Trypsin-Lösung noch einmal variiert. Die erste Hälfte der Ansätze inkubierte nach Aufgabe der Trypsin-Lösung für ca. 30 min bei 37°C, bis alle Zellen gelöst waren. Die zweite Hälfte der Ansätze inkubierte bei Raumtemperatur (ca. 20°C) für ca. 1h bis zur vollständigen Ablösung der Zellen. Die Streuung der Ergebnisse der Ansätze mit bei 37°C abgelösten Zellen war im Gegensatz zu den Ergebnissen der bei Raumtemperatur abgelösten Zellen deutlich geringer. Unter Berücksichtigung dieser

Ergebnisse erfolgte in den folgenden Versuchen die Ablösung der Zellen über 30 min bei 37°C.



**Abb.19** Bindung von  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin(1-31)}$  in Abwesenheit [Kontrolle K] und Gegenwart von  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin(1-31)}$  ( $10^{-5}$  M) an Keratinozyten (HaCaT;  $11 \times 10^6$  Zellen/ml) in Suspension unter Variation des Ablöseprozesses.  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Doppelbestimmungen eines Versuchs.

(1): Ablösung bei Raumtemperatur (Ablösezeit 1h)

(2): Ablösung im Brutschrank bei 37°C (Ablösezeit ½ h)

### 5.3.1.2 Inkubationstemperatur

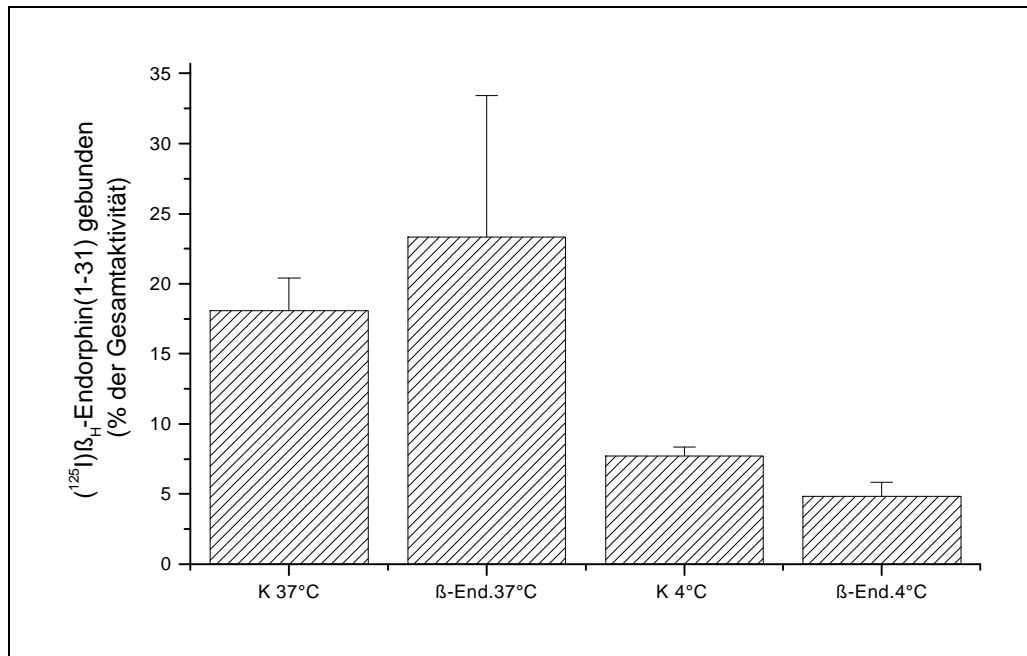
Zur Sondierung des Einflusses der Inkubationstemperatur wurde in einem Experiment eine Hälfte der Ansätze bei 37°C und die andere Hälfte bei 4°C inkubiert. Es ließ sich im 37°C-Ansatz eine  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin-Bindung}$  von ca. 20% des  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphins (1-31)}$  im Ansatz messen. Diese Bindung erwies sich als irreversibel, d.h. sie ließ sich nicht durch im Überschuß eingesetztes, nicht-markiertes  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin(1-31)}$ ,  $10^{-5}$  M, verdrängen. Bei dieser Temperatur könnte es zu einer Internalisierung von  $(^{125}\text{I})\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin}$  gekommen sein.

Im 4°C-Ansatz wurde eine zwar geringere ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung von ca. 7% gemessen, aber diese Bindung ließ sich durch das im Überschuß eingesetzte  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin verdrängen.

Die Kontrolle der Zellviabilität beider Versuchsansätze zeigte eine höhere Letalität der Zellen im 37°C-Versuch von 20-25%, im Gegensatz zu ca. 10% in den 4°C-Experimenten.

Auffällig war außerdem die hohe Streuung der Ergebnisse der 37°C-Versuche, welche im Zusammenhang mit der hohen Anzahl zugrunde gegangener Zellen gestanden haben könnte.

Die folgenden Versuche wurden aufgrund dieser Ergebnisse bei 4°C durchgeführt.



**Abb.20** Bindung von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) in Abwesenheit [Kontrolle K] und Gegenwart von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) ( $10^{-5}$  M) an Keratinozyten (HaCaT;  $31,6 \times 10^6$  Zellen/ml) in Suspension bei 4 und 37°C.  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Doppelbestimmungen eines Versuchs.

### 5.3.2 Strukturspezifität der Bindung

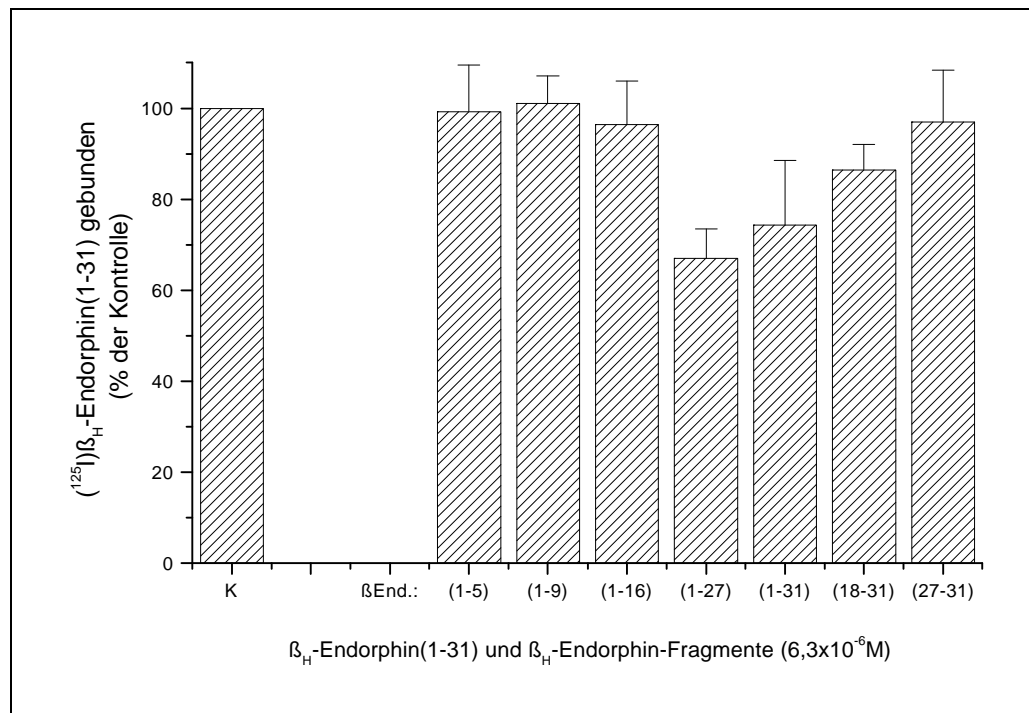
Die Strukturspezifität der Bindung wurde durch Messung der Bindung von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) in Anwesenheit von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin und von verschiedenen  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Fragmenten untersucht.

In Ansätze mit einer Zellkonzentration von  $10^7$  Zellen/Ansatz, die während der Inkubation auf dem „Taumler“ bewegt wurden, wurde die Bindung des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) durch den Einsatz von  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) und  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-27) deutlich reduziert [ $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) auf ca. 75%;  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-27) auf ca. 67%]. Auch  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(18-31) reduzierte die Bindung des Radioliganden auf ca. 87%. Keinen Einfluß auf die ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung zeigten die N- und C-terminalen Fragmente [ $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-5), (1-19), (1-16) sowie (27-31)].

Die Verdrängung des Radioliganden wurde in Bezug auf die Kontrolle (K=100%) dargestellt. Die Bindung von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin in Abwesenheit von Verdrängern betrug 5% des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) im Ansatz.

Sowohl bei Einsatz höherer als auch bei Einsatz niedrigerer Zellkonzentrationen wurde das gleiche Verdrängungsprofil der eingesetzten  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Fragmente beobachtet.

Die Strukturspezifität der  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten der Zelllinie HaCaT in Suspension entsprach genau der Strukturspezifität der  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung, wie sie bei adhärennten Keratinozyten in der Zellkultur beobachtet worden war. Es handelte sich also tatsächlich um eine Bindung des  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphins an den Zellen und nicht an eine nicht-zelluläre Komponente der Keratinozyten-Zellkultur. Im Hinblick auf die stark streuenden Werte bei Durchführung von Pilotversuchen zur Prüfung der Reversibilität der Bindung wurde deshalb auf die Bestimmung weiterer Bindungscharakteristika verzichtet.



**Abb.21** Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin an Keratinozyten in Suspension in Abwesenheit [Kontrolle K] oder in Gegenwart von β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) bzw. β<sub>H</sub>-Endorphin-Fragmenten (6,3 x 10<sup>-6</sup> M) (HaCaT; 10<sup>7</sup> Zellen/Ansatz). Bindung des (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphins in Abwesenheit von Verdrängern: 5% des (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphins (1-31) im Ansatz.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 bis 3 Versuchen.

## 5.4 Ergebnisse weiterführender Untersuchungen zur Freisetzung von β<sub>H</sub>-Endorphin und weiteren Peptiden aus Keratinozyten

Mit den folgenden Experimenten wurde der Versuch unternommen, eine mögliche Freisetzung von β<sub>H</sub>-Endorphin-, N-Acetyl-β<sub>H</sub>-Endorphin- und [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-immunoreaktivem Material (IRM) aus Keratinozyten nachzuweisen. Es wurde die von Chakraborty et al. (1996) entwickelte Methode (s. 4.2ff.) verwendet. Um möglichst umfassende Ergebnisse über die Syntheseleistung der Keratinozyten zu erhalten, wurde die Freisetzung von β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31), von N-Acetyl-β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) und von [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin nach UVB-Stimulation untersucht. In Anlehnung an die hypophysäre Freisetzung von Proopiomelanocortin-Fragmenten (s. 1.2.1) sollte mit der Suche nach β<sub>H</sub>-Endorphin eine mögliche Existenz des corticotrophen und mit



N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin die des melanotropen Systems in Keratinozyten sondiert werden.

Außerdem wurde unter dem Aspekt des Vergleichs mit hypophysären Mechanismen zusätzlich eine mögliche Freisetzung von [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin untersucht. Die Ergebnisse sind im einzelnen in den folgenden Punkten dargestellt. Die Zellen wuchsen bis zur 100% igen Konfluenz am Versuchstag heran. Die Kontroll-Schalen, die keiner UV-Stimulation ausgesetzt wurden, enthielten am Tag der Aufarbeitung durchschnittlich  $12,4 \times 10^6$  Zellen/ml. Auf Schalen, die mit einer Intensität von  $10 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlt wurden, wurden bei der Aufarbeitung  $9,8 \times 10^6$  Zellen/ml gezählt (ca. 79% der ursprünglichen Konzentration in Bezug auf die Kontrolle). Ansätze, die einer Bestrahlungsintensität von  $25 \text{ mJ/cm}^2$  ausgesetzt wurden, enthielten am Tag der Aufarbeitung  $5,7 \times 10^6$  Zellen/ml (ca. 46% der Kontrolle) und in den Ansätzen, die mit der höchsten Intensität von  $50 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlt wurden, hatte sich die Anzahl der Zellen auf  $2,1 \times 10^6$  Zellen/ml reduziert (ca. 17% der Kontrolle).

Es konnte kein Anstieg von  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-, N-Acetyl- $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin(1-31)- oder von [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-immunoreaktivem Material unter UVB-Einfluß gemessen werden weder im Überstand noch im Lysat (siehe 5.4.1ff.).

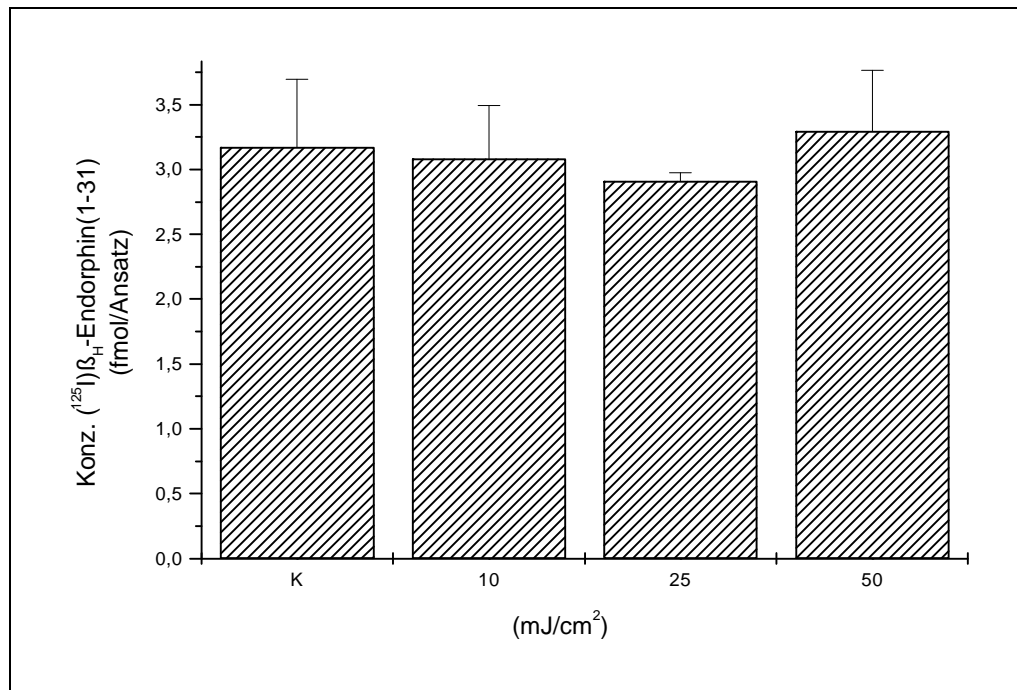
Bei Umrechnung der Peptidkonzentration im Ansatz auf die einzelne Zelle (Ergebnisse nicht dargestellt) war allerdings ein signifikanten Anstieg der Peptidkonzentrationen mit steigender Bestrahlungsintensität erkennbar. Es wurden Kontrollversuche, in denen die Zellkonzentrationen nach der Stimulation angeglichen wurden, d.h. es wurden die zugrunde gegangenen Zellen ersetzt, so daß in allen Ansätzen die gleiche Zellkonzentration unabhängig der Bestrahlungsintensität vorlagen, durchgeführt. In diesen Versuchen ließ sich ebenfalls keine Steigerung der Peptidkonzentration mit zunehmender Bestrahlungsintensität nachweisen.

#### **5.4.1 $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-immunoreaktives Material**

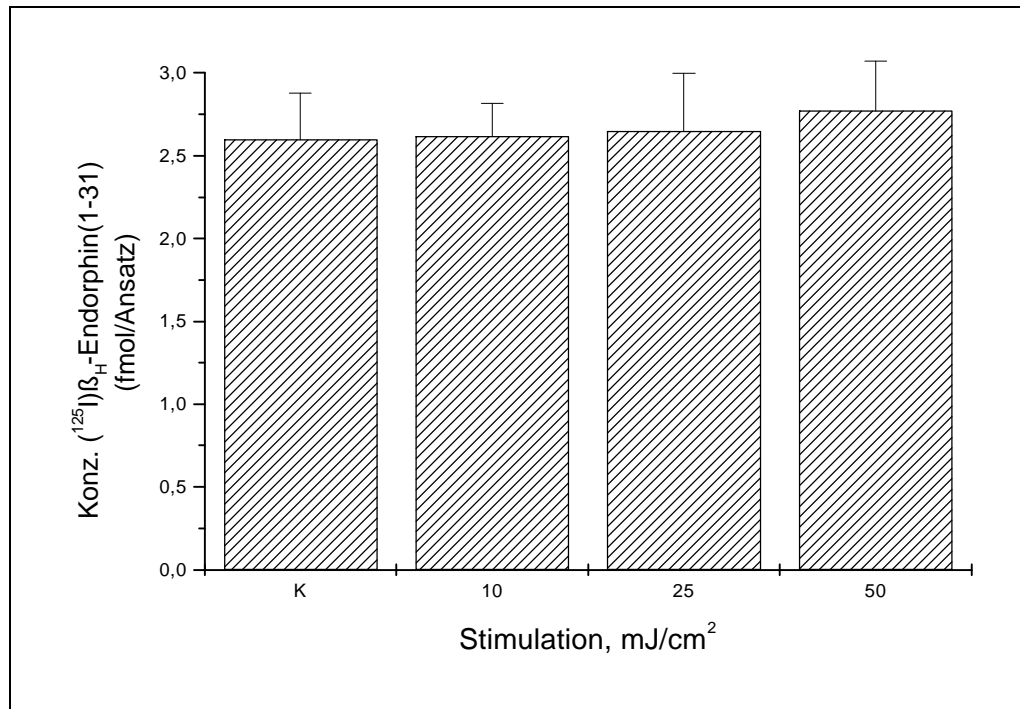
Die Keratinozyten wurden wie unter 4.2ff. beschrieben verarbeitet. Die Bestimmung des  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-immunoreaktiven Materials ( $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-IRM) in Extrakten von Lysat und Überstand erfolgte im FP RIA. Die Kontrolle diente als Referenzwert. In den Abbildungen 22 und 23 ist die gemessene  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin-IRM Konzentration in fmol/Ansatz dargestellt. In den Überständen war kein Anstieg der

Peptidkonzentration mit steigender Bestrahlungsintensität zu erkennen (Abb.22). Es wurde konstant eine Peptidkonzentration von  $\approx 3$  fmol/Ansatz gemessen.

In den Lysaten konnte ein tendenzieller Anstieg der Peptidkonzentration mit Zunahme der Bestrahlungsintensität gemessen werden. Die bestimmte Peptidkonzentration lag mit Werten um 2,5 fmol/Ansatz geringfügig unter den im Überstand gemessenen Werten.



**Abb.22** Konzentrationen von  $\beta_{\text{H}}\text{-Endorphin-IRM}$  in fmol/Ansatz ohne [Kontrolle K] und nach UVB-Bestrahlung mit steigenden Intensitäten (10, 25 und 50 mJ/cm) in Keratinozytenkulturüberständen (Keratinozytenzelllinie HaCaT; Aussaatdichte  $3,5 \times 10^5$  Zellen/Schale; 100% Konfluenz der Kontrolle);  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.



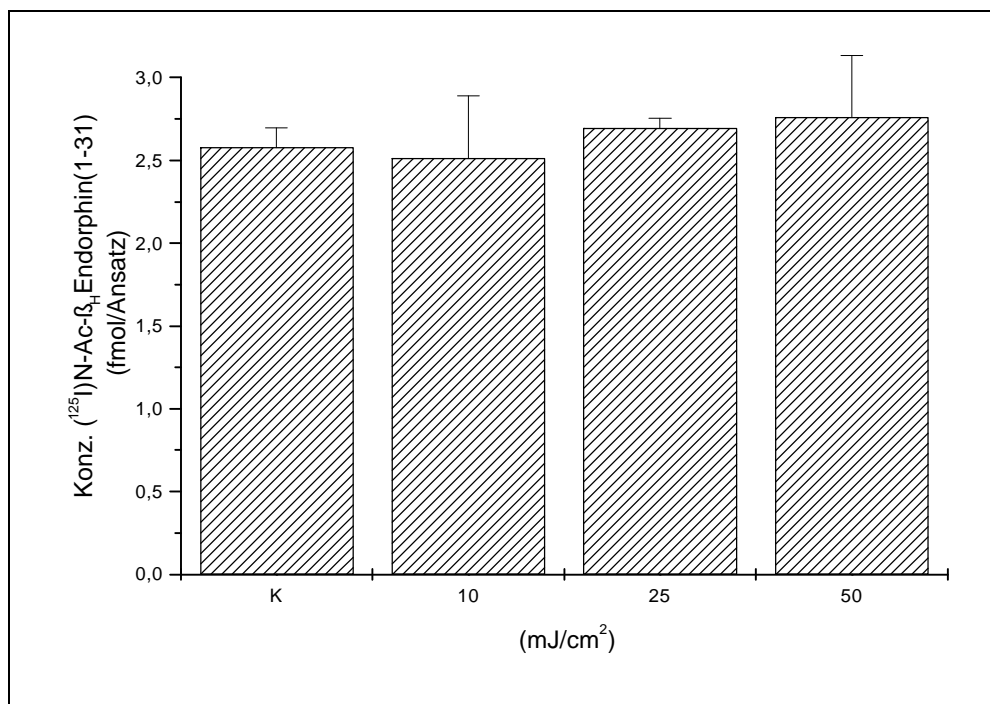
**Abb.23** Konzentrationen von β<sub>H</sub>-Endorphin-IRM in fmol/Ansatz ohne [Kontrolle K] und nach UVB-Bestrahlung mit steigenden Intensitäten (10, 25 und 50 mJ/cm) in Keratinozytenlysaten (Keratinozytenzelllinie HaCaT; Aussaatdichte 3,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/Schale; 100% Konfluenz der Kontrolle).  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

#### 5.4.2 N-Acetyl-β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31)-immunoreaktives Material

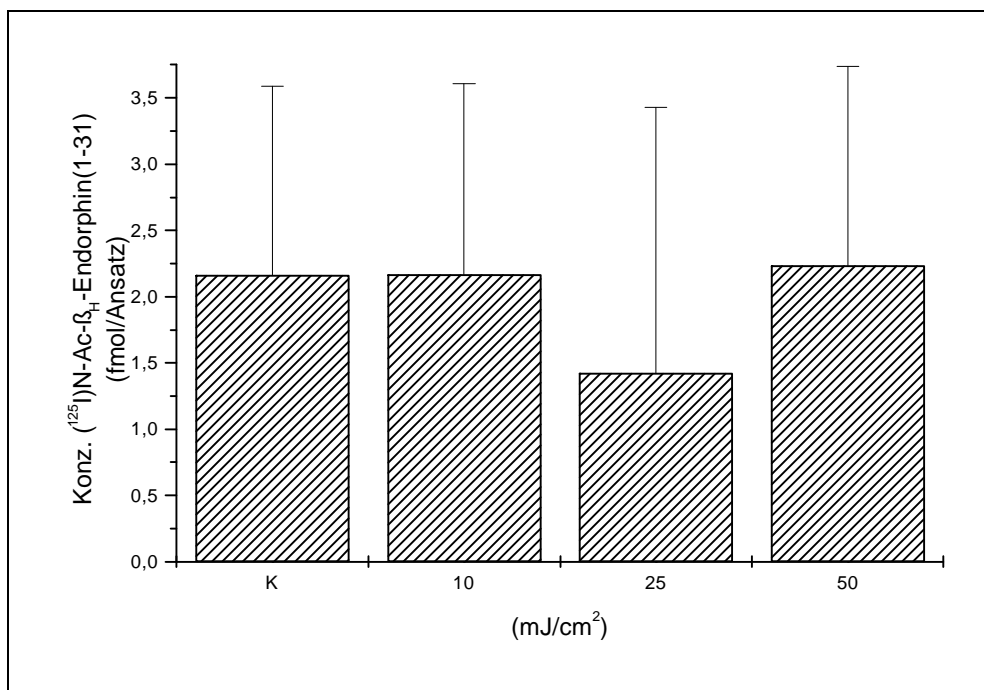
Wie für β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31) wurde auch die Peptidkonzentration von N-Acetyl-β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31)-immunoreaktivem Material [N-Acetyl-β<sub>H</sub>-Endorphin(1-31)-IRM] im Überstand und im Lysat der Keratinozytenkulturen nach UV-Bestrahlung bestimmt. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 24 und 25 gezeigt.

Sowohl in den Ansätzen der Überstände wie auch der Lysate ließ sich kein signifikanter Anstieg der Peptidkonzentration mit wachsender Bestrahlungsintensitäten nachweisen.

Im Überstand war scheinbar ein geringer Anstieg erkennbar. Die Ergebnisse der Ansätze der Lysate ließen aufgrund der extremen Streuung keine exakten Aussagen zu.



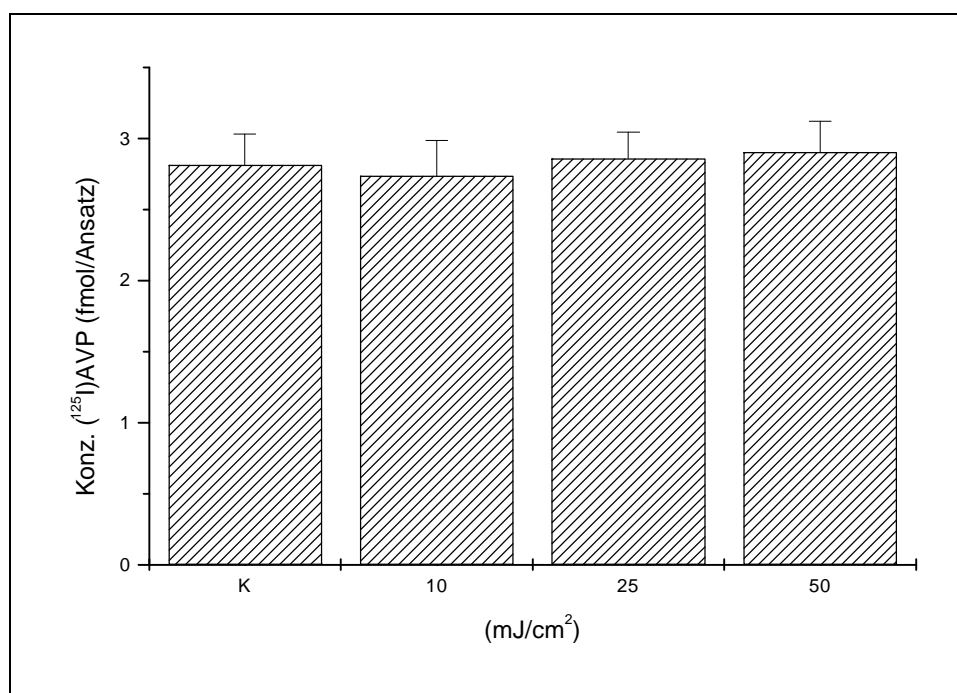
**Abb.24** Konzentrationen von N-Acetyl- $\beta_{\text{H}}$ -IRM in fmol/Ansatz ohne [Kontrolle K] und nach UVB-Bestrahlung mit steigenden Intensitäten (10, 25 und 50 mJ/cm) in Keratinozytenkulturüberständen (Keratinozytenzelllinie HaCaT; Aussaatdichte  $3,5 \times 10^5$  Zellen/Schale; 100% Konfluenz der Kontrolle).  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.



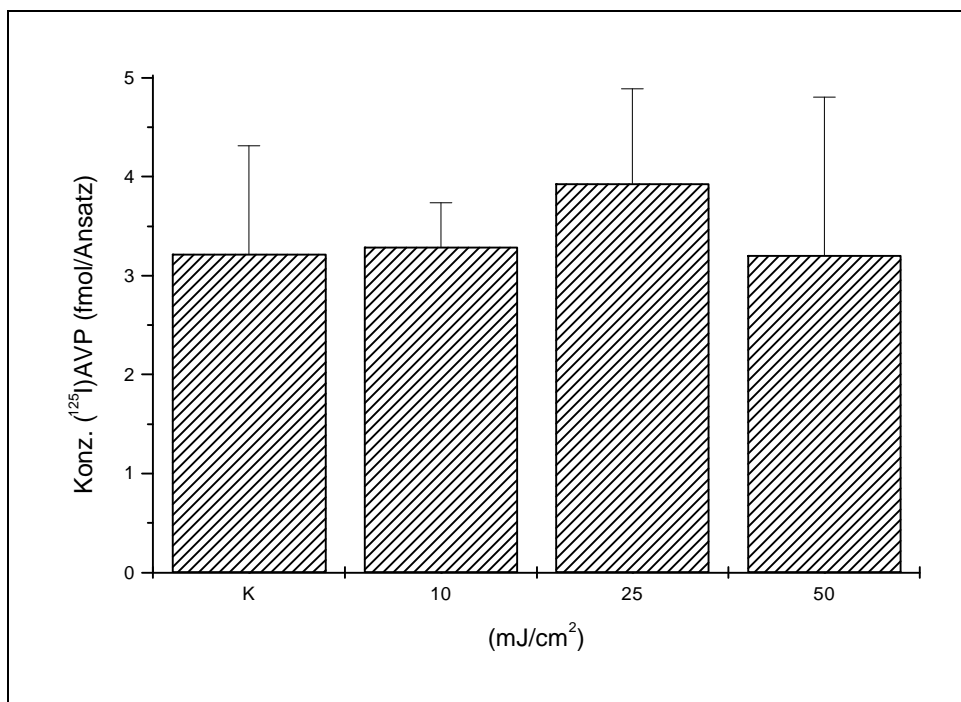
**Abb.25** Konzentrationen von N-Acetyl-β<sub>H</sub>-Endorphin-IRM in fmol/Ansatz ohne [Kontrolle K] und nach UVB-Bestrahlung mit steigenden Intensitäten (10, 25 und 50 mJ/cm) in Keratinozytenlysaten (Keratinozytenzelllinie HaCaT; Aussaatdichte 3,5 x 10<sup>5</sup> Zellen/Schale; 100% Konfluenz der Kontrolle).  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

#### 5.4.3 [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-immunoreaktives Material

Auch die Experimente zur Untersuchung der [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-Freisetzung zeigten keinen Anstieg der Peptidkonzentrationen, weder in den Überständen noch in den Lysaten (dargestellt in Abbildung 26 und 27). In den Überständen wurden Peptid-Konzentrationen, wie auch in den beiden vorhergegangenen Untersuchungen, von  $\approx 3$  fmol/Ansatz bestimmt. Die Ergebnisse der Ansätze mit Zellysate unterlagen, wie schon unter 5.4.2 aufgefallen, einer hohen Streuung.



**Abb.26** Konzentrationen von AVP-IRM in fmol/Ansatz ohne [Kontrolle K] und nach UVB-Bestrahlung mit steigenden Intensitäten (10, 25 und 50 mJ/cm) in Keratinozytenkulturüberständen (Keratinozytenzelllinie HaCaT; Aussaatdichte  $3,5 \times 10^5$  Zellen/Schale; 100% Konfluenz der Kontrolle).  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.



**Abb.27** Konzentrationen von AVP-IRM in fmol/Ansatz ohne [Kontrolle K] und nach UVB-Bestrahlung mit steigenden Intensitäten (10, 25 und 50 mJ/cm) in Keratinozytenlysaten (Keratinozytenzelllinie HaCaT; Aussaatdichte  $3,5 \times 10^5$  Zellen/Schale; 100% Konfluenz der Kontrolle).  $\bar{x}_{\text{mean}} \pm \text{SD}$  aus Mittelwerten von Doppelbestimmungen aus 2 Versuchen.

## 6 Diskussion

### 6.1 Methoden

#### 6.1.1 Untersuchungen zu Nachweis und Charakterisierung der Bindung von $\beta_H$ -Endorphin(1-31) an Keratinozyten und Vitronektin aus Keratinozytenkulturen

##### 6.1.1.1 Auswahl der Keratinozytenzelllinie HaCaT

Ziel dieser Arbeit war es, nähere Erkenntnisse über die Funktion und Bedeutung des  $\beta_H$ -Endorphins in Bezug auf das Organ Haut zu gewinnen.

Um eine Untersuchung zur funktionellen Bedeutung von  $\beta_H$ -Endorphin in Keratinozytenkulturen durchführen zu können, wurde ein adäquates Zellmodell benötigt.

Für die Durchführung der Versuche wurden zum Teil Zellkonzentrationen von 50 Mio. Zellen/ml benötigt. Um diese hohe Anzahl von Zellen bereitstellen zu können, wurde auf eine in vitro kultivierbare Zelllinie zurückgegriffen.

Die Keratinozytenlinie HaCaT ist eine immortalisierte Keratinozytenzelllinie des erwachsenen Menschen. Diese epitheliale Zelllinie bildet in vitro ein ordentlich strukturiertes und differenziertes epitheliales Gewebe und stellte somit ein vielversprechendes Werkzeug zum Studium von humanen Hautzellen dar (*Boukamp et al., 1988*).

Das schnelle Wachstum dieser Zellen ermöglichte es, in kurzen Zeitabständen die jeweils benötigte Zellmenge zu produzieren. In Anzucht und Verarbeitung erwiesen sich die nicht malignen Zellen als unproblematisch. Die Keratinozytenlinie HaCaT zeigte sich in der Handhabung sehr widerstandsfähig und robust. In Experimenten mit aus dem Zellverband herausgelösten Zellen (siehe 4.1.3) lag die durchschnittliche Mortalitätsrate unter 20%. Mit Verwendung der Keratinozytenzelllinie HaCaT wurde zudem auf keine unbekannte Zelllinie zurückgegriffen; Informationen über Eigenschaften dieser Zelllinie konnten aus der Veröffentlichung von Boukamp et al. (1988) entnommen werden.



Die Haut besteht zu 90% aus Keratinozyten, die aus Stammzellen der Basalschicht entstehen und in einem streng regulierten Differenzierungsgang die Epidermis durchlaufen. Während dieser Differenzierung ist eine Veränderung der Zelloberfläche und auch der damit verbundenen Rezeptorexpression nicht auszuschließen. Um Versuche mit vergleichbaren Ergebnissen durchführen zu können, wurden für diese Untersuchungen ausschließlich Zellen der Passagen 35-50 zwei Tage nach deren Aussaat verwendet. In dieser Zeit wuchsen die Zellen stets zur 100%igen Dichte heran.

Einen weiteren Vorteil der Keratinozytenzelllinie stellte die Tatsache dar, daß die Keratinozyten sowohl im adhärenenten wie auch in aus dem Zellverband gelösten Zustand eingesetzt werden konnten. Es waren somit Versuche zur Bindung von  $\beta_H$ -Endorphin in Keratinozytenkulturen wie auch mit suspendierten, losgelösten Zellen möglich.

Als problematisch erwies sich allerdings der Einsatz der Zellen im Suspensionsversuch. Die Zellen zeigten eine deutliche Neigung zur Aggregation bzw. zur Adhärenz, was wohl ihrem Verhalten unter in vivo-Bedingungen entspricht.

Des weiteren konnte für eine einheitliche Qualität der adhärenenten Keratinozyten im Schalenversuch nicht garantiert werden. Schalen wurden zwar in gewissem Umfang unter dem Mikroskop auf Konfluenz und Form der Keratinozytenmonolayer überprüft, allerdings konnte eine partielle Übereinanderlagerung der Zellen nicht in allen Schalen ausgeschlossen werden.

Sehr empfindlich reagierten die Zellen auf Feuchtigkeitsverlust. Eine stetige Benetzung der Zellen mit Pufferlösung oder Kulturmedium war für die Vitalität der Keratinozyten von entscheidender Bedeutung. Besonders zum Tragen kam dieses Problem bei Versuchen zur Untersuchung der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an adhärenenten Keratinozyten. Da unter Absättigung der C-terminalen Bindungsstelle die Konzentration der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen in der Keratinozytenkultur sehr gering war, wurde eine möglichst große Zellkonzentration und damit verbunden eine sehr große Kulturschale für diese Experimente verwendet. Die Versuchsdurchführung erforderte ein hohes Maß an experimenteller Präzision, denn die Kulturschalen mußten genau waagrecht stehen, damit die Keratinozytenzellschicht kontinuierlich mit der Inkubationslösung bedeckt war.

In diesen Experimenten wurde in regelmäßigen Abständen der waagrechte Stand der Reaktionsschalen mittels Wasserwaage kontrolliert.

### 6.1.1.2 Bindungsversuche

#### 6.1.1.2.1 Bindungsversuche mit Keratinozytenkulturen

Für die Experimente mit Keratinozytenkulturen wurde die von Schüle et al. (1996) beschriebene Bindungsmethode mit geringen Modifikationen verwendet. Dieser Bindungsversuch wurde bis zu jenem Zeitpunkt für den Nachweis des [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin V2 Rezeptors auf adhärennten COS.M6 (Nierenzellen) und Ltk (Mäusefibroblasten) verwendet. Die Methode ließ sich gut auf den Nachweis von  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen in der Keratinozytenkultur übertragen. Dem Puffer D-PBS wurde zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen BSA in einer Konzentration von 0,1% (v/w) zugesetzt. Das eingesetzte Inkubationsvolumen wurde auf die Schalengröße abgestimmt. Eine vollständige Benetzung der Zellen war stets gewährleistet.

Da in der Keratinozytenkultur mehrere Binder für  $\beta_H$ -Endorphin vorhanden waren, wurden Experimente zur Differenzierung dieser Binder unternommen (siehe 5.1.1ff.). Alle Versuche wurden bei 0-4°C durchgeführt, um mögliche Stoffwechselfunktionen und Enzymaktivitäten in den Zellen weitgehend auszuschließen.

##### 6.1.1.2.1.1 Blockade unspezifischer Bindungsstellen

Um eine Anlagerung von Peptiden an die Wände der Zellkulturschalen zu verhindern, wurde allen Waschpuffern und Inkubationslösungen BSA in einer Konzentration von 0,1% (w/v) zugesetzt. Die Peptide wurden außerdem ebenfalls in einer 0,1 % BSA-Lösung in den Versuch eingebracht. Mit der Verwendung von BSA zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen wurde auf eine vielfach zu diesem Zweck eingesetzte Substanz zurückgegriffen. Wöhner verglich die Potenz von BSA mit anderen Substanzen und mit Ergebnissen ohne Blockade unspezifischer Bindungsstellen. Er fand keine relevanten Unterschiede im Vergleich mit Magermilchpulver oder Fischgelantine, aber eine Verdopplung des Blank-Anteils an der Gesamtbindung, wenn auf eine Blockade unspezifischer Bindungsstellen verzichtet wurde (Wöhner, 1998).

Wie die Ergebnisse unter 5.1.1ff. zeigen, erfolgte scheinbar trotzdem eine Bindung von  $\beta_H$ -Endorphin an die Schale.  $\beta_H$ -Endorphin band dort höchstwahrscheinlich über das Fragment (6-17). Nun ist es unwahrscheinlich, daß eine Zellkulturschale an sich eine spezifische Bindungsstelle für  $\beta_H$ -Endorphin präsentiert. Wahrscheinlicher wäre eine Interaktion von Bestandteilen des Kulturmediums mit dem Schalenmaterial, die zur Bildung einer Bindungsstelle für  $\beta_H$ -Endorphin an der Schalenwand führen könnte. Da diese Bindungsstelle in Versuchsansätzen mit Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Keratinozytenzellschicht abgedeckt wurde, erfolgten keine weiteren Bemühungen, die Binder des  $\beta_H$ -Endorphins näher zu charakterisieren.

#### **6.1.1.2.1.2 Blockade der C-terminalen $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle auf Vitronektin**

Um ausschließlich die  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an die Zelle bestimmen zu können, mußte die C-terminale Bindungsstelle in der Keratinozytenkultur zuvor abgesättigt sein. Mit Einsatz des C-terminalen Fragments  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) und Reduktion des FCS-Anteils als Zusatz des Zellkulturmediums DMEM wurde dieser Forderung Folge geleistet.

Nach Reduktion des FCS von 10% auf 1% verblieb eine ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin-Restbindung von ca. 7%. Durch den Einsatz von  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) in  $10^{-2}$  M Konzentration konnte die C-terminale Bindungsstelle komplett abgesättigt werden (siehe Abb.14). Zusätzlich wurde das C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment bereits eine Stunde vor Einsatz weiterer Verdränger den Reaktionsgefäßen zugesetzt, damit genügend Zeit zur vollständigen Absättigung der Bindungsstellen zur Verfügung stand.

Die C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle ließ sich somit mittels Reduktion des FCS und Einsatz von  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) vollständig absättigen.

Die verbleibende ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin-Bindung betrug ca. 1% des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphins (1-31) im jeweiligen Ansatz. Da eine weitere Verdrängung durch  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) möglich war, wurde die Existenz von weiteren  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen in der Keratinozytenkultur vermutet (Abb.13).

#### **6.1.1.2.1.3 Vorbereitung und Inkubation der Versuchsansätze**

Nach Abnahme des Zellkulturmediums mußte eine ständige Benetzung des Zellayers durch Waschpuffer oder Inkubationslösung gewährleistet sein, damit die Zellen nicht durch Austrocknen geschädigt wurden. Durch sorgfältiges Absaugen des jeweiligen Überstandes und die sofortige Aufgabe erneuter Flüssigkeit durch eine zweite Person konnte diese Forderung erfüllt werden. Die Inkubation erfolgte auf Eis im Kühlraum, um eine konstante Temperatur von 0°C einzuhalten. Des weiteren wurde extrem auf den waagerechten Stand der Schalen geachtet, der mit einer Wasserwaage in regelmäßigen Abständen kontrolliert wurde. Dies erwies sich von besonderer Bedeutung bei der Untersuchung der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle auf adhärennten Keratinozyten, da sich in diesen Versuchen nur ein geringes Inkubatvolumen auf der Schale befand.

#### **6.1.1.2.1.4 Negativkontrolle (Blank)**

In der Keratinozytenkultur konnten verschiedene Binder für  $\beta_H$ -Endorphin nachgewiesen werden. War somit das Erstellen einer Negativkontrolle überhaupt möglich?

Im Bindungsversuch mit Keratinozytenkulturen befand sich am Boden der Schale die Keratinozytenschicht. Diese verhinderte wohl mehr oder weniger den Kontakt des Radioliganden oder anderer Komponenten des Inkubates mit dem Schalenboden.

In Versuchen mit Zellkulturschalen, die nur das Kulturmedium enthielten, war die Bindung an die Zelle ausgeschlossen, aber die Bindung an die Schale und daran absorbierte Komponenten des Kulturmediums möglich. Die Ergebnisse des Kontrollversuchs zeigten, daß nach Elimination des FCS zwar ein Binder eliminiert wurde, aber nach wie vor eine  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an die Schale erfolgen konnte. Die Kapazität dieser nicht-FCS-abhängigen Bindungsstelle an der Schalenwand war ähnlich groß wie die FCS-abhängige Bindungskapazität. Daraus ergab sich der Schluß, daß FCS einerseits die Bindungsstelle für das  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment  $\beta_H$ -Endorphin(6-17) an der Schalenwand abdeckte und andererseits seinerseits einen

C-terminal bindenden  $\beta_H$ -Endorphin-Binder lieferte, der auch wieder an die Schalenwand absorbiert wurde.

Aufgrund der Komplexität dieser  $\beta_H$ -Endorphin-Binderkonstellation war das Erstellen einer Negativkontrolle, wie sie in Bindungsversuchen üblich ist, nicht möglich.

#### **6.1.1.2.2 Untersuchung der Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an Keratinozyten in Suspension**

Zur Untersuchung der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an aus dem Zellverband herausgelösten und in Suspension gebrachten Keratinozyten wurde die von Schweigerer et al. (1985) beschriebene Methode eines Zentrifugationsassays mit geringer Modifikation eingesetzt (siehe 4.1.3).

Es wurde mit dieser Methode ein bei EL4 Thymozyten erprobtes Verfahren zum Nachweis von  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen auf Suspensionszellen verwendet.

Um die Versuchsmethode auf die Keratinozytenzelllinie zu übertragen, mußte der Krebs-Ringer-Tris-Puffer durch PBS defec ersetzt werden. Die Versuche wurden stets bei 0-4°C durchgeführt, um zelluläre Stoffwechselprozesse auszuschließen. Besonders eine bei höheren Temperaturen mögliche Internalisierung des gebundenen ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin(1-31) sollte verhindert werden.

Die Kultivierung der Keratinozyten erfolgte, wie unter 4.1.1.1.2 beschrieben, mit einer FCS-Konzentration von 10% im Kulturmedium DMEM. Über das FCS wurde offenbar eine C-terminale Bindungsstelle, aller Wahrscheinlichkeit nach Vitronectin, in die Keratinozytenkultur eingebracht. Die Lokalisation des Vitronectins im interzellulären Bereich bzw. im Bereich der Extrazellulären Matrix wäre allerdings auch mit einer Vitronectin-Expression durch die Zelle kompatibel. Da in den Suspensionsversuchen keine ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin(1-31)-Bindung über das C-terminale Fragment mehr nachgewiesen werden konnte (s. 5.3.2), mußte die C-terminale Bindungsstelle durch Ablösen und mehrfaches Waschen der Zellen entfernt worden sein. Das entspräche auch der Ablösung von Komponenten der Extrazellulären Matrix, wie sie bei einem derartigen Verfahren erwartet werden können.

#### **6.1.1.2.2.1 Konvektion der Reaktionsansätze während der Inkubationszeit**

Nach Zugabe aller Komponenten zu den Inkubationsansätzen erfolgte die zweistündige Inkubation. Wurden die Ansätze während dieser Zeit nicht bewegt, kam es zum Absinken und zur Ablagerung der Zellen auf dem Boden der Inkubationsgefäße. Durch die dichte Aneinanderlagerung der Zellen war deren Interaktion mit den in der Lösung enthaltenen Reaktionspartnern, wie z.B. dem ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin, eingeschränkt. Eine Bewegung der Inkubationsgefäße war nötig, um die Zellen in Lösung zu halten.

Um eine ausreichende Konvektion zu gewährleisten, wurden die in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen angesetzten Ansätze vor der Inkubation in 13 ml Sarstedt-Röhrchen transferiert und dann auf dem „Taumler“ sanft bewegt. Neben der schonenden Inkubation, zeigte sich eine gute Durchmischung der Ansätze, da die 13 ml-Röhrchen einen breiten und flachen Boden besaßen - im Gegensatz zu den spitz zulaufenden 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen.

#### **6.1.1.2.2.2 Zentrifugation der Reaktionsansätze**

Ein Testversuch mit verschiedenen Zentrifugationszeiten zeigte keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse nach 5, 10 oder 15 min Zentrifugationsdauer. Die Zentrifugationszeit wurde auf 10 min festgelegt.

#### **6.1.1.2.2.3 Negativkontrolle (Blank)**

In Suspensionsversuchen konnten im Gegensatz zu Versuchen in der Zellkultur Negativkontrollen durchgeführt werden, da in diesem Versuchsansatz sowohl eine  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung an Bestandteile des Inkubationsmediums wie auch eine Bindung an die Reaktionsgefäße mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnten. Die Art der Trennung von gebundenen und nicht zellgebundenem Tracer legte über dies eine Negativkontrolle nahe. Es konnte auf diese Weise

festgestellt werden, welche Menge an nicht zellgebundener Radioaktivität bei der Zentrifugation in die Spitzen der Beckman-Zentrifugen-Röhrchen gelangte.

#### **6.1.1.3 Untersuchungen zur Freisetzung von $\beta_H$ -Endorphin, N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin und [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin aus Keratinozyten der Zelllinie HaCaT**

Es sollte mit diesen Experimenten der Versuch unternommen werden, im Anschluß an den Nachweis von  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen auf Keratinozyten eine mögliche autokrine Funktion dieser Bindungsstellen nachzuweisen.

Die Freisetzung von POMC-Fragmenten unter UV-Bestrahlung wurde von Wintzen et al. bereits beschrieben (*Wintzen et al., 1996*).

Es sollte versucht werden, diese Daten zu reproduzieren.

Die Durchführung dieser Experimente erfolgte in strikter Anlehnung an die von Chakraborty et al. und Wintzen et al. beschriebenen Versuchsmethoden (*Chakraborty et al., 1996; Wintzen et al., 1996*).

##### **6.1.1.3.1 Auswahl der Zellen**

Wintzen et al. und Chakraborty et al. nutzten für ihre Experimente native Keratinozyten der Passage 2, während unsere Experimente mit einer Keratinozytenzelllinie (HaCaT) in Passagen 35-50 durchgeführt wurden. Unterschiede zwischen Zellen der HaCaT-Linie und nativen Keratinozyten waren allerdings zu erwarten.

##### **6.1.1.3.2 Zellpräparation**

Die Präparation der Zellen wurde gemäß der Versuchsanordnung durchgeführt. Da die Zellen während der Bestrahlung anstelle ihres Kulturmediums nur mit Puffer ohne

Nährstoffe bedeckt waren, wurde besonders auf den sehr kurzen Zeitraum des Nährstoffdefizites geachtet. Ein Zeitraum von 15 min wurde niemals überschritten. Trotzdem war es nicht möglich die Freisetzung  $\beta_H$ -Endorphin-, N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin- und [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-immunoreaktivem Material nachzuweisen.

## 6.2 Ergebnisse

In den vorliegenden Untersuchungen konnten Erkenntnisse über die mögliche Bindung von  $\beta_H$ -Endorphin an Keratinozyten gewonnen werden.

Im ersten Schritt wurde eine C-terminale Bindung des  $\beta_H$ -Endorphins in der Zellkultur nachgewiesen. Aufgrund der Übereinstimmung der hier erhobenen Befunde mit bekannten Daten zur  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Vitronektin wurde eine Bindung des Opioidpeptids an Vitronektin in der Keratinozytenzellkultur vermutet. Mit Hilfe spezifischer Vitronektin-Antikörper konnte dann das Glykoprotein in der Zellkultur identifiziert werden.

Des weiteren wurde eine  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung auf adhärenenten wie auch in Suspension vorliegenden Keratinozyten, die offenbar über Mittelfragmente des Peptids erfolgte, nachgewiesen.

### 6.2.1 Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an Vitronektin in Keratinozytenzellkulturen

Wir postulierten eine  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Vitronektin in der Keratinozytenkultur HaCaT.

Die auffällige Übereinstimmung der Bindungscharakteristika der C-terminalen  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung in der Keratinozytenkultur mit Daten aus Experimenten von Hildebrand et al. (1989) und Wöhner (1998) weckten den Anschein, es könnte sich bei diesem Binder um Vitronektin handeln. Besonders die Ergebnisse in Experimenten zur Strukturspezifität der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung verstärkten diese Vermutung. Ebenso wie von Wöhner (1998) beschrieben, erfolgte die  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung über den C-Terminus des Opioidpeptids. Die starke inhibitorische Potenz der letzten beiden Aminosäuren (30-31) war besonders prägnant. Die letzte



Aminosäure des Peptids, Glutamat<sup>31</sup>, konnte allein die (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindung zwar nicht hemmen, war aber für die Bindung von essentieller Bedeutung. Das am C-Terminus um 4 Aminosäuren verlängerte Fragment β<sub>H</sub>-Endorphin(28-35) (siehe Abb.10), sowie das C-terminale β-Endorphin-Fragment vom Truthahn (Tyr-Lys-Lys-Gly-Gln) (nicht dargestellt), welches anstelle des Glutamats einen Glutaminrest trägt, hatten keinen Einfluß auf die Bindung von (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin. Glutamat<sup>31</sup> scheint somit entscheidend an der Non-Opioid-Bindung von β<sub>H</sub>-Endorphin beteiligt zu sein. Damit eine β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindung an Vitronectin erfolgen konnte, mußte es in der Keratinozytenkultur vorhanden gewesen sein.

Die Existenz des Glykoproteins Vitronectin konnte in der Zellkultur eindeutig mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Entgegen Studien von Dahlbäck et al. (1993), die Vitronectin auch intrazellulär in Keratinozyten des Menschen nachweisen konnten, schien Vitronectin in der Keratinozytenkultur HaCaT nur im Bereich der Zelloberfläche lokalisiert zu sein. Dort könnte es, verankert in der Extrazellulären Matrix, zur Adhäsion der Zellen beigetragen haben.

Die Herkunft des Vitronectins konnte nicht eindeutig geklärt werden. Vitronectin könnte von den Zelle synthetisiert und in der Extrazellulären Matrix deponiert worden sein. Ähnliche Prozesse wurden für weitere Adhäsivproteine in Endothelzellen beschrieben (*Jaffe et al., 1974; Jaffe and Mosher, 1978*), auch humane Monozyten besitzen die Fähigkeit Vitronectin zu synthetisieren und zu sezernieren (*Hetland et al., 1989*).

Mit hoher Wahrscheinlichkeit gelangte Vitronectin aber über das fetale Kälberserum (FCS) in die Zellkultur, welches ebenso wie humanes Serum substantielle Mengen an Vitronectin enthält (*Hayman et al., 1983*) und dem Kulturmedium DMEM in einer Konzentration von 10% zugesetzt wurde. Die in Abb.4 dargestellte Reduktion der (<sup>125</sup>I)β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindung durch das C-terminale β<sub>H</sub>-Endorphin-Fragment in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration im DMEM läßt sich am einfachsten mit der Präsenz von Vitronectin im FCS interpretieren; über den FCS-Zusatz zum Kulturmedium könnte Vitronectin dann auch in die Zellkultur gelangt sein. Ein Rückgang der β<sub>H</sub>-Endorphin-Bindung von 20% auf 7% bei Reduktion des FCS-Anteils von 10 auf 1% im DMEM-Kulturmedium ist ebenfalls mit der Herkunft des Binders Vitronectin aus dem FCS kompartibel.

Es wäre allerdings auch möglich, daß das in der Zellkultur vorgefundene Vitronectin sowohl von den Zellen als auch vom FCS stammte.

Der eindeutige Beweis einer  $\beta_H$ -Endorphin-/Vitronektin-Interaktion konnte letztlich nicht erbracht werden. Die Verifizierung dieser Interaktion könnte z.B. durch Erstellung einer Fluoreszenzmikroskopie/Bindungs-Korrelation erfolgen.

Aufgrund der prägnanten Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen Charakteristika der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Vitronektin und der nachgewiesenen Existenz des Glykoproteins in der Keratinozytenkultur HaCaT, führten wir die C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung jedoch auf eine Bindung an Vitronektin zurück.

## **6.2.2 Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an Keratinozyten der Zelllinie HaCaT**

### **6.2.2.1 Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an adhärente Keratinozyten in Keratinozytenzellkulturen**

Wie unter 5.1.1 dargestellt, befanden sich in der Keratinozytenkultur mehrere potentielle Binder für  $\beta_H$ -Endorphin, u.a. Vitronektin. Unter der Absättigung der auf Vitronektin lokalisierten Bindungsstelle sollte nach  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen auf Keratinozyten gesucht werden.

Eine weitere Bindungsstelle für das  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment  $\beta_H$ -Endorphin(6-17) an der Zellkulturschale (s. 5.1.1) schien durch den Zusatz von FCS in einer Konzentration von 10% abgedeckt zu sein. In Experimenten zur Untersuchung einer möglichen  $\beta_H$ -Bindung an adhärente Keratinozyten wurde die FCS-Konzentration auf 1% reduziert, womit diese Bindungsstelle erneut dem Liganden zugänglich gewesen sein könnte. Da aber in diesen Experimenten die Keratinozyten eine konfluente Zellschicht auf dem Schalenboden bildeten, ist es schwer vorstellbar, daß Bindungsstellen auf der Schale dem  $(^{125}\text{I})\beta_H$ -Endorphin in größeren Umfang zugänglich gewesen sein könnten. Ausgeschlossen werden konnte es allerdings weiterhin nicht. Erst in Experimente mit aus dem Zellverband herausgelösten und resuspendierten Keratinozyten ließen sich derartige Binder mit Sicherheit eliminieren. Die mit resuspendierten Keratinozyten gewonnenen Ergebnisse bestätigten dann die in der Keratinozytenkultur nachgewiesene  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung über das Mittelfragment des Opioidpeptids. Die Zellkulturschale hatte keine  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an adhärente Keratinozyten vorgetäuscht.

Diese  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an adhärenenten Keratinozyten in der Zellkultur erfolgte über das Mittelfragment, es handelte sich somit um eine „Non-Opioid-Bindung“. Dieses Ergebnis wies eine deutliche Diskrepanz zu den Studien von Bigliardi und Mitarbeitern auf. Diese Arbeitsgruppe hatte kürzlich einen  $\mu$ -Opioidrezeptor auf nativen Keratinozyten beschrieben (*Bigliardi et al., 1998*).

Für die hier gefundene  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung wurden im Computerprogramm LIGAND zwei Dissoziationskonstanten berechnet:  $K_{D1}=2,7 \times 10^{-7}$  M und  $K_{D2}=2,1 \times 10^{-5}$  M. Es handelte sich demnach um zwei niederaffine  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen. Um Opioidrezeptoren konnte es sich dabei nicht handeln; diese zeigen höhere Affinitäten mit niedrigeren  $K_D$ -Werten.

#### 6.2.2.2 Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an Keratinozyten in Suspension

Die Experimente mit Keratinozyten in Suspension boten die sichere Aussagemöglichkeit über eine  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an die Zelle selbst unter Ausschluß nicht-zellulärer Bindungsstellen. Durch Auflösung des Zellverbandes wurde die Extrazelluläre Matrix größtenteils zerstört, ebenso konnte das Kulturmedium mit seinen verschiedenen Bestandteilen, wie z.B. FCS, mit hoher Wahrscheinlichkeit entfernt werden. Es war deshalb nicht notwendig, C-terminale Bindungsstellen abzusättigen.

In diesen Experimenten bestätigte sich die in der Keratinozytenkultur nachgewiesene  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten über das Mittelfragment. In Ansätzen mit  $10^7$  Zellen/Ansatz erfolgte eine signifikante Hemmung der ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin-Bindung durch  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) sowie durch die  $\beta_H$ -Endorphin-Fragmente  $\beta_H$ -Endorphin(1-27) und  $\beta_H$ -Endorphin(18-31). Keinen Einfluß hatten  $\beta_H$ -Endorphin(1-5) und  $\beta_H$ -Endorphin(1-9) auf die ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin-Bindung. Auch wurde in keinem der Versuche eine Hemmung der ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_H$ -Endorphin-Bindung durch das C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) beobachtet. Eine N- und C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten konnte somit ausgeschlossen werden. Demnach befand sich weder ein Opioidrezeptor noch Vitronektin im Inkubat oder auf den Zellen. Vitronektin wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der Ablösung der Zellen entfernt. Die nachgewiesenen Bindungsstellen müssen somit auf der Zelle lokalisiert gewesen sein. In Versuchen mit verringerter oder erhöhter Zellkonzentration pro Ansatz

zeigten sich übrigens fast identische Ergebnisse (die in dieser Arbeit nicht dokumentiert sind).

Es wurden Experimente zur Reversibilität der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten in Suspension durchgeführt (nicht dargestellt). Aufgrund der starken Streuung der Daten konnten aber, insgesamt betrachtet, keine signifikanten Ergebnisse erhalten werden. Es waren jedoch Experimente darunter, die eine Reversibilität der Bindung eindeutig zeigten. Möglicherweise war die Letalität der Zellen von durchschnittlich 15% für das Fehlschlagen dieser Experimente verantwortlich.

Eine weitere Hypothese wäre die Freisetzung von Rezeptorpartikeln, die zunächst dem Liganden nicht zugänglich waren, die dann aber durch unbekannte Faktoren, z.B. rein mechanisch durch die Bewegung der Reaktionsansätze, freigesetzt wurden und als frei in Lösung befindliche Rezeptor-Mikrovesikel dem Liganden zur Verfügung gestanden haben könnten. Die Existenz von Rezeptor-Mikrovesikeln wurde in der Literatur zum einen von Mack et al. (2000) anhand des CCR5-Rezeptors beschrieben und auch Preissner et al. (2000) beschrieb die Existenz von löslichen extrazellulären Rezeptor-Mikrodomänen des Urokinase-Rezeptors.

Streufaktoren, gleich welcher Art, fallen bei Messungen eines Gleichgewichtszustands, wie er bei Prüfung der Strukturspezifität zugrunde lag, viel weniger ins Gewicht als bei kleinen Messungen in verschiedenen Stadien eines sich einstellenden Gleichgewichts, wie das bei Prüfung der Reversibilität der Bindung gegeben war. Dies mag die Hauptursache für die stärkere Streuung der Befunde gewesen sein.

#### **6.2.2.3 Vergleich der Strukturspezifität der Bindung von $\beta_H$ -Endorphin an adhären Zellen und an Zellen in Suspension der Keratinozytenzelllinie HaCaT**

Die Strukturspezifität der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung wurde sowohl bei adhären Keratinozyten wie auch bei aus dem Zellverband gelöste Keratinozyten in Suspension untersucht.

Im Vergleich der Verdrängung des ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) durch die einzelnen  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Fragmente ergaben sich folgende Übereinstimmungen bzw. Diskrepanzen:

$\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-27) hemmte, sowohl in der Zellkultur, wie auch auf den Keratinozyten in Suspension die ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31)-Bindung am potentesten. Während es in der Zellkultur die Bindung von ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) auf ca. 90% reduzierte, erfolgte auf den Zellen in Suspension eine Hemmung der ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31)-Bindung auf ca. 66%.

Das vollständige Peptid  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31) setzte wie zu erwarten, sowohl in der Zellkultur wie auch auf den Keratinozyten in Suspension die ( $^{125}\text{I}$ ) $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-31)-Bindung in der Größenordnung wie  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin(1-27) herab. Auch ansonsten waren keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindungsversuche an Keratinozyten in Zellkultur und in Suspension zu erkennen. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß es sich in beiden Fällen um die gleichen Bindungsstellen für  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin handelte.

### **6.2.3 Die Bindungsstelle des $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Mittelfragments – eine „Subsite“ des Chemokin-Rezeptors CCR5?**

Mit Hilfe des Computerprogramms LIGAND wurden die Bindungsdaten für die  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten der Zelllinie HaCaT ermittelt. Die  $K_{\text{D}}$  betrug  $1,24 \times 10^{-6}$  M und die zugehörige  $B_{\text{MAX}}$  betrug  $1,12 \times 10^{-8}$  M. Es handelte sich demnach um eine niederaffine Bindungsstelle mit einer recht hohen Bindungskapazität.

Interessanterweise wies eine, im Rahmen weiterer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (*Poloczek, Dissertation 2002*) nachgewiesene  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindungsstelle auf Monozyten ähnliche Bindungscharakteristika auf: Es handelte sich ebenfalls um eine  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung über das Mittelfragment mit ähnlichen Bindungsparametern. Die  $K_{\text{D}}$  dieser Bindungsstelle betrug  $6,6 \times 10^{-7}$  M und die zugehörige  $B_{\text{MAX}}$   $4,0 \times 10^{-8}$  M. Bei beiden Bindungsstellen handelte es sich also offensichtlich um relativ niederaffine Mittelfragment-Bindungsstellen des  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphins mit hoher Bindungskapazität. Die  $\beta_{\text{H}}$ -Endorphin-Bindung an Monozyten erwies sich allerdings in Experimenten zur OFF-Kinetik als irreversibel, während in

Experimenten zur Reversibilität der  $\beta_H$ -Bindung an Keratinozyten in Suspension aufgrund der starken Streuung der Werte keine signifikanten Befunde erhoben werden konnten. Es wäre möglich, daß auch hier unter bestimmten Bedingungen, die nicht durchwegs vorgelegen hatten, die Bindung irreversibel wurde. Poloczek hatte Hinweise darauf, daß es sich bei der von ihm untersuchten Bindungsstelle um den CCR5-Rezeptor handelte.

Bei einer Recherche nach Homologien mit  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) mit Hilfe von Proteindatenbanken fand er heraus, daß ein ebenfalls an Monozyten bindendes Molekül, eine Teilsequenz des gp 120-Hüllproteins von HIV, gp 120(219-232) zu 66% mit  $\beta_H$ -Endorphin(1-31) übereinstimmt. HIV benötigt das Hüllprotein gp 120 u.a., um über den CD4-Rezeptor in seine Zielzellen eindringen zu können. Für das erfolgreiche Einschleusen des Virus wird allerdings ein weiterer Rezeptor benötigt. Bei Infektionsbeginn ist dies der CCR5-Rezeptor (*Poloczek, Dissertation 2002*). Der CCR5-Rezeptor wird vor allem von Zellen des Immunsystems exprimiert. Des weiteren wurde er aber auch auf Neuronen, Astrozyten, Kapillar-Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Epithelien nachgewiesen. Seine funktionelle Bedeutung ist hier noch unklar (*Murphy et al., 2000*). Untersuchungen von Mack et al. (2000) zeigten, daß Zellen, die primär CCR5-negativ waren und auch selbst kein CCR5 exprimieren konnten, durch CCR5-Rezeptor-Mikrovesikel in CCR5-positive Zellen überführt werden konnten.

Der CCR5-Rezeptor scheint ein im Organismus weit verbreiteter Rezeptor zu sein, auch wenn über seine Funktion wenig bekannt ist. Die Ähnlichkeit der Bindungsdaten der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle auf Monozyten mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen  $\beta_H$ -Bindungsstelle auf Keratinozyten könnten die Aussage stützen, daß es sich hierbei um eine Teileinheit, d.h. ein „Subsite“ des CCR5-Rezeptors handelt. Möglicherweise bildet  $\beta_H$ -Endorphin einen Baustein im Gefüge der funktionellen Bedeutung dieses Rezeptors.

#### 6.2.4 Die physiologische Bedeutung einer $\beta_H$ -Endorphin-/Vitronektin-Interaktion in der Haut

Mit Nachweis einer  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Vitronektin in Keratinozytenkulturen und der  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an Keratinozyten direkt stellte sich auch die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser Bindungen.

Die Interaktion von  $\beta_H$ -Endorphin und Vitronektin könnte z.B. eine pathophysiologische Rolle bei der Psoriasis spielen. Es wurden mehrfach erhöhte  $\beta_H$ -Endorphin-Spiegel bei Patienten mit Psoriasis oder Neurodermitis bestimmt (*Glinski et al., 1993 und 1994*). Des weiteren konnten in vitro Studien mit humaner Epidermis eine durch  $\beta_H$ -Endorphin gesteigerte Expression von Cytokeratin 16, einem Indikator für Hyperproliferation und Differenzierung von erkrankten Hautzellen, insbesondere bei Psoriasis, zeigen. In diesen Untersuchungen wurde gleichzeitig eine Downregulierung des  $\mu$ -Opioidrezeptors nachgewiesen (*Bigliardi et al., 2000*).

Auch Vitronektin-Ablagerungen wurden in sklerotischen und nekrotischen Geweben, wie z.B. in degenerativen Hauterkrankungen gefunden.

Eine Interaktion von  $\beta_H$ -Endorphin und Vitronektin wäre also denkbar.

Eine weitere Möglichkeit der Interaktion von  $\beta_H$ -Endorphin mit Vitronektin könnte bei Wundheilungsprozessen gegeben sein.

Der Prozeß der Wundheilung könnte durch die zelladhäsionsvermittelnde Eigenschaft des Vitronektins und die Unterstützung der Blutgerinnung positiv beeinflußt werden. Vitronektin scheint über eine Förderung der Adhäsion und „Spreading“ von Zellen das Wachstum von Zellen zu beschleunigen. Mit Hilfe von Fibronektin vermag es die Anheftung und Aggregation von Thrombozyten an verletzte Gefäßwände zu unterstützen (*Marguerie et al., 1982*).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, vermag das POMC-Fragment  $\beta_H$ -Endorphin über das Mittelfragment an Keratinozyten zu binden. Über eine Bindung an Vitronektin über den C-Terminus des Peptids, könnte  $\beta_H$ -Endorphin möglicherweise eine „Brücke“ bilden und somit Vitronektin vermehrt an die Zellen binden und den Prozeß der Wundheilung weiter verstärken.

Auch auf die lokale Infektabwehr der Haut könnte sich eine  $\beta_H$ -Endorphin-/Vitronektin-Interaktion positiv auswirken. Eine Interaktion von  $\beta_H$ -Endorphin mit Zellen des Immunsystems wurde mehrfach beschrieben. Opioidrezeptoren wurden auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen. Neben einer

Bindung über den N-Terminus tritt  $\beta_H$ -Endorphin mit diesen Zellen auch über den C-Terminus in Kontakt.

Auch Vitronektin beeinflusst die Immunabwehr. Neben Wirkungen auf das Komplementsystem scheint Vitronektin an rezeptorvermittelten Phagozytosereaktionen von peripheren Blutmonozyten beteiligt zu sein und somit die Phagozytose von Bakterien durch Monozyten zu fördern (*Parker et al., 1988*). In der Tat vermittelt Vitronektin die Adhäsion von Bakterien an Zellen, z.B. Endothelzellen und bewirkt damit eine erwünschte Lokalisation der Immunreaktion. In der Haut könnten so gebundene Bakterien u.a. von Zellen des ortständigen Immunsystems der Haut leichter eliminiert werden. Gleichzeitig könnte Vitronektin durch Eingriff in Prozesse des Komplementsystems – Hemmung der Polymerisation von C9 – körpereigene Zellen schützen.

Eine Interaktion von  $\beta_H$ -Endorphin mit Zellen des ortständigen oder zirkulierenden Immunsystems der Haut über den N-Terminus einerseits und mit Keratinozyten (über das Mittelfragment oder den N-Terminus) und Vitronektin (über den C-Terminus) andererseits, könnte die Infektabwehr fördern.

### **6.3 Proopiomelanocortin (POMC) und seine Fragmente in der Haut**

POMCmRNA wurde in stimulierten sowie in nicht stimulierten humanen Keratinozyten nachgewiesen (*Slominski et al., 1992; Farooqui et al., 1993*). Wintzen et al. (1996) beschrieben 1996 die Expression von POMC und die Freisetzung von POMC-Spaltprodukten, wie  $\beta$ -LPH und  $\beta_H$ -Endorphin, aus Keratinozyten. Diese sollte durch u.a. durch UV-Strahlung modulierbar sein.

#### **6.3.1 Expression von POMC in Hautzellen**

Die Expression von POMC mRNA in Zellen epidermaler Herkunft, inklusive Keratinozyten und Melanozyten, wurde mehrfach beschrieben (*Chakraborty et al., 1996; Wintzen et al., 1996*). Durch Behandlung der Zellen mit bestimmten Stimulanzen ließ sich die POMC-Expression steigern. In der 1996 veröffentlichten



Studie beschrieben Wintzen et al. eine 1,5 fache Steigerung der POMC mRNA Konzentration in Keratinozytenkulturen 24 h nach UV-Stimulation.

Das in menschlichen Hautzellen nachgewiesene POMC-Transkript besitzt eine Größe von 1.1, 1.2 oder 1.3 kb, entsprechend des in der Hypophyse und Hypothalamus gefundenen POMC-Transkripts (*Autelitano et al., 1989; Luger et al., 1998; Schauer et al., 1994; Wintzen et al., 1996*) auch kürzere Varianten wurden beschrieben (*Slominski et al., 2000*). Auch die für die Aufspaltung des Precursors verantwortlichen Enzyme konnten in Hautzellen nachgewiesen werden (*Wakamatsu et al., 1997*), ob allerdings der Vorgang der Aufspaltung auf identische Weise wie in der Hypophyse erfolgt, ist zur Zeit noch Gegenstand der Forschung. Eine Aufspaltung des POMC-Moleküls scheint allerdings zu erfolgen, da POMC-Spaltprodukte in Hautzellen nachgewiesen werden konnten.

### 6.3.2 Freisetzung von POMC-Fragmenten aus Hautzellen

In der von Wintzen et al. (1996) publizierte Studie wurde eine gesteigerte Freisetzung von  $\beta$ -LPH und  $\beta_{H-}$ Endorphin in Hautzellen nach Stimulation mit TPA, IL-1 $\alpha$  und UVB-Strahlung beschrieben.

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, die von Wintzen et al. (1996) beschriebene gesteigerte Freisetzung von  $\beta_{H-}$ Endorphin aus Hautzellen nach Stimulation mit UVB-Strahlung ebenfalls nachzuweisen. Trotz exakter Übernahme der Versuchsanordnung konnten die Ergebnisse dieser Studie nicht reproduziert werden. In keinem der unter 5.4ff. dargestellten Versuche wurde ein Anstieg der Konzentrationen von  $\beta_{H-}$ Endorphin(1-31)- oder von N-Acetyl- $\beta_{H-}$ Endorphin(1-31)-immunoreaktivem Material als Folge einer UV-Stimulation gemessen. Lediglich in Einzelversuchen gelang es, einen Anstieg der Peptidkonzentrationen im Ansatz nachzuweisen. Wie ist die gescheiterte Reproduktion der Daten aus Experimenten von Wintzen et al. zu erklären?

In der Literatur wird die Produktion von POMC-Spaltprodukten in der Haut zur Zeit kontrovers diskutiert. Wintzen et al. mußten ihre Aussage von 1996 korrigieren. Schon in der 1996 veröffentlichten Studie wurde erwähnt, daß der Nachweis von gesteigerten  $\beta_{H-}$ Endorphin-Spiegeln in Keratinozyten nach UV-Stimulation nicht in allen Experimenten geglückt war, was aber auf eine relative Instabilität der Methode

zurückgeführt wurde. In späteren Untersuchungen gelang auch dieser Arbeitsgruppe der Nachweis einer gesteigerten  $\beta_H$ -Endorphin-Freisetzung in Keratinozyten als Folge einer UV-Stimulation nur noch unter Nährstoff-abhängigen Bedingungen (*Wintzen et al., 2000*).

Ursächlich könnte die Nachweismethode für diese fraglichen Ergebnisse verantwortlich sein. Die im RIA eingesetzten Antikörper erkennen lediglich bestimmte Aminosäuresequenzen des nachzuweisenden Peptids. Es wird ausschließlich immunoreaktives Material nachgewiesen. Geringste Veränderung dieser Sequenz könnten dazu geführt haben, daß der Antikörper das Peptid nicht mehr erkannte. Ebenso könnten mögliche Kreuzreaktionen des Antikörpers mit physiologisch ähnlichen Molekülen zu Fehlinterpretationen geführt haben.

Die Aufspaltung des POMC in der Hypophyse erfolgt entweder allein durch Prohormon Convertase (PC) 1 oder durch PC1 und PC2 in Kombination. PC1 alleine spaltet POMC in 16K-Fragment, ACTH und  $\beta$ -LPH und dieses wiederum in  $\beta$ -Endorphin und  $\gamma$ -LPH. PC2 spaltet ACTH nach den ersten 14 Aminosäuren zu ACTH(1-14)OH und  $\beta$ -LPH zu  $\beta$ -MSH und Restpeptid (*Bertagna, X., 1994; Castro and Morrison, 1997*). Bisher konnte nur PC1 in der Haut nachgewiesen werden. PC1 wird sogar unter UV-Stimulation in Keratinozyten verstärkt gebildet (*Brzoska et al., 1997*).

Es wäre möglich, daß in der Haut andere Spaltenzyme vorkommen. Die Existenz von in ihrer Länge veränderten POMC-Peptiden wäre ebenfalls durchaus denkbar. Studien von Wakamatsu et al. stützen diese Hypothese. Der Autor beschrieb eine verstärkte Spaltung von ACTH(1-39) in kleinere Fragmente, wie ACTH(1-17) und ACTH(1-10) in Keratinozyten (*Wakamatsu et al., 1997*).

Ein wesentlicher Punkt auf der Suche nach einer Erklärung für den gescheiterten Nachweis einer gesteigerten  $\beta_H$ -Endorphin-Freisetzung in Keratinozyten, könnte die Auswahl der Zellen sein. Wintzen et al. führten ihre Experimente ausschließlich mit nativen Zellen durch, während wir mit einer immortalisierten Zelllinie arbeiteten. Die Zellen könnten im nativen Zustand tatsächlich die Fähigkeit besitzen, POMC zu exprimieren und vielleicht auch  $\beta_H$ -Endorphin freizusetzen, diese Fähigkeit könnte aber bei der Überführung in eine Zelllinie verloren gegangen sein.

Diese Hypothese wird durch noch nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe Teschemacher (Pharmakologie der JLU Gießen) gestützt.

Obwohl die Freisetzung von  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin in Hautzellen weiterhin fraglich ist, scheinen POMC-Fragmente doch an der Beantwortung von Streß in der Haut beteiligt zu sein. CRH steigert die Freisetzung von POMC-Fragmenten. Das CRH-Gen und auch CRH-Rezeptoren wurden in der Haut nachgewiesen. Da Hautzellen in der Lage sind sowohl CRH wie auch POMC selbst zu synthetisieren, liegt die Vermutung nahe, daß in der Haut ein eigenes Streß-beantwortendes System existiert, über das sie in der Lage ist, vom ZNS unabhängig auf Streß (wie z.B. UV-Strahlung) adäquat zu reagieren (Übersicht bei Slominski et al., 2000).  $\beta$ <sub>H</sub>-Endorphin könnte ein Baustein dieses Streß-beantwortenden Systems sein.

### 6.3.3 Freisetzung von [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin aus Hautzellen

Das Corticotrophe Releasing Hormon (CRH) und auch Arginin-Vasopressin (AVP) sind bekannte Stimulatoren für die Freisetzung von POMC-Fragmenten aus corticotrophen Zellen der Hypophyse.

Sowohl die Expression des CRH-Precursors wie auch die Freisetzung von CRH konnte in Keratinozyten nachgewiesen werden (*Slominski et al., 1995*). In dieser Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, eine Freisetzung von [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-immunoreaktiven Material aus Keratinozyten nach UV-Stimulation nachzuweisen.

Auch in diesen Experimenten konnte kein Anstieg des gesuchten Materials als Folge einer UV-Stimulation gemessen werden. Dieses negative Ergebnis könnte auf die schon unter 6.3.2 diskutierten Ursachen zurückzuführen sein. Um nähere Erkenntnisse über eine mögliche [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-Freisetzung in Keratinozyten zu erhalten, sollten Untersuchungen zum Nachweis des [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-Precursors in Keratinozyten durchgeführt werden. Wenn der Precursor nachweisbar sein sollte, sollte die Möglichkeit einer Freisetzung von [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin weiter untersucht werden.

## 7 Zusammenfassung

Eine gesteigerte Freisetzung des Opioidpeptids  $\beta_H$ -Endorphin aus der Hypophyse ins Blut wurde häufig als Antwort des Organismus auf körperlichen oder psychischen Stress beobachtet. Über die funktionelle Bedeutung des  $\beta_H$ -Endorphins in den peripheren Geweben des Organismus ist jedoch nichts bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer möglichen Interaktion von  $\beta_H$ -Endorphin mit Hautzellen, um Erkenntnisse über eine funktionelle Bedeutung des Opioidpeptids in der Haut zu gewinnen. Als Modell wurden humane Keratinozyten der Zelllinie HaCaT verwendet.

Im ersten Schritt konnte eine Bindung des  $\beta_H$ -Endorphins über sein C-terminales Fragment an eine Bindungsstelle in der Keratinozytenkultur nachgewiesen und in weiteren Experimenten charakterisiert werden. Auffällige Übereinstimmungen der Bindungscharakteristika mit Ergebnissen aus früheren Untersuchungen, in denen die  $\beta$ -Endorphin-Bindung an Vitronektin, ein multifunktionales  $\alpha 1$ -Glykoprotein aus der Familie der Adhäsionsproteine, charakterisiert wurde, ließen auf eine  $\beta_H$ -Endorphin-Interaktion mit Vitronektin in der Zellkultur schließen. Vitronektin konnte dann tatsächlich mittels immunfluoreszenzmikroskopischer Technik auf der Zelloberfläche der Keratinozyten nachgewiesen werden.

Im zweiten Schritt konnte eine spezifische Bindungsstelle für  $\beta_H$ -Endorphin auf Keratinozyten in Keratinozytenzellkulturen gezeigt werden. Der Nachweis dieser niederaffinen Bindungsstelle war nach Absättigung der C-terminalen  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstelle durch das C-terminale  $\beta_H$ -Endorphin-Fragment  $\beta_H$ -Endorphin(27-31) möglich. Die Bindung erfolgte über das Mittelfragment des Opioidpeptids.

Um sicherzustellen, daß diese Bindungsstelle tatsächlich auf der Zelle und nicht auf anderen Komponenten der Zellkultur lokalisiert war, wurden Experimente mit aus dem Zellverband gelösten, in Suspension gebrachten Keratinozyten durchgeführt.

Auch in diesen Experimenten gelang der Nachweis einer  $\beta_H$ -Endorphin-Bindung an die Zellen. Auch sie erfolgte über das Mittelfragment des Peptids. Bei beiden nachgewiesenen Bindungen handelte es sich somit um nicht-opioide Interaktionen.

Untersuchungen zur Prüfung der Hypothese einer gesteigerten Freisetzung von  $\beta_H$ -Endorphin-, N-Acetyl- $\beta_H$ -Endorphin- und [Arginin<sup>8</sup>]Vasopressin-immunoreaktivem Material aus Keratinozytenkulturen nach UV-Stimulation zeigten nur negative Ergebnisse. Ob POMC tatsächlich in Hautzellen exprimiert und somit  $\beta_H$ -Endorphin tatsächlich in Keratinozyten synthetisiert wird, ist auch in der Literatur zur Zeit Gegenstand der Diskussion. Als Ligand der nachgewiesenen spezifischen  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen auf Keratinozyten käme somit  $\beta_H$ -Endorphin in Frage, das aus anderen POMC-exprimierenden Zellen der Haut oder an weiteren POMC-Expressions-Orten im Organismus, insbesondere aus der Hypophyse, freigesetzt wird.

Bis heute ist die funktionelle Bedeutung von  $\beta$ -Endorphin im menschlichen Organismus außerhalb des ZNS ungeklärt. Auch über die physiologische Bedeutung einer  $\beta_H$ -Endorphin-Vitronektin-Interaktion kann lediglich spekuliert werden. Die verstärkte Ablagerung von Vitronektin in sonnenexponiertem oder degenerativ-entzündlich verändertem Gewebe der Haut, die Involvierung des Glykoproteins in Blutgerinnung, Zytoadhäsion und Zytomigration und in Prozesse des Immunsystems einerseits sowie die Tatsache einer gesteigerten  $\beta_H$ -Endorphin-Ausschüttung bei Patienten mit degenerativen Hauterkrankungen, die Interaktion des Opioidpeptids mit Zellen des Immunsystems und der Nachweis von  $\beta_H$ -Endorphin-Bindungsstellen auf Keratinozyten andererseits sind mit einem Zusammenwirken beider Substanzen bei physiologischen und pathologischen Prozessen in der Haut kompatibel.

Es bleibt abzuklären, ob die Interaktion des  $\beta_H$ -Endorphins mit Vitronektin einerseits und mit Keratinozyten andererseits funktionelle Bedeutung im Rahmen der lokalen Immunabwehr besitzt oder eventuell sogar Wundheilungsprozesse fördert.

## **Veröffentlichungen auf der Grundlage der vorliegenden Dissertationsschrift:**

### **Publikationen:**

Egeling, K.; Dickopf, B.; Müller, H.; Preissner, K.T.; Haberberger, R.; Teschemacher, H.: Specific binding sites of  $\beta_H$ -Endorphin on cells of a human keratinocyte cell line, HaCaT.

In Preparation

Egeling, K.; Müller, H.; Karschunke, B.; Tschischka, M.; Spennemann, V.; Hain, B.; Teschemacher, H.:

Specific binding sites for  $\beta$ -Endorphin on keratinocytes

Ann.N.Y.Acad.Sci., 885, 464-465 (1999)

### **Poster:**

Egeling, K.; Müller, H.; Karschunke, B.; Tschischka, M.; Spennemann, V.; Hain, B.; Teschemacher, H.:

Specific binding sites for  $\beta$ -Endorphin on keratinocytes

New York Academy of Science meeting on „Cutaneous Neuroimmunomodulation: The Proopiomelanocortin System“, Münster 1998

Egeling, K.; Müller, H.; Hain, B.; Teschemacher, H.:

Spezifische Bindungsstellen von  $\beta$ -Endorphin auf Keratinozyten

Werkstattberichte 1999, JLU Gießen

### **Einträge:**

Literature database PRF/LITDB:

<http://www.prf.or.jp/>

Accession number: 2617871

## 8 Literaturverzeichnis

- Akama, T.; Yamada, K.M.; Seno, N.; Matsumoto, I.; Kono, I.; Kashiwagi, H.; Funaki, T.; Hayashi, M.: Immunological characterization of human vitronectin and its binding to glycosaminoglycans.  
J. Biochem. 100, 1343-1351 (1986)
- Akil, H.; Watson, S.J.; Young, E; Lewis, M.E.; Khachaturian, H.; Walker, J.M.:  
Endogenous opioids: Biology and function.  
Ann. Rev. Neurosci. 7, 223-255 (1984)
- Alexander, S.P.H.; Peters, J.A.: 1998 Receptors and Ion Channel Nomenclature Supplement.  
Elsevier Trends Journals (1998)
- Autelitano, D.J.; Lundblad, J.R.; Blum, M.; Robertson, J.L.: Hormonal regulation of POMC gene expression.  
Ann. Rev. Physiol. 51, 715-726 (1989)
- Barnes, D.W.; Silnutzer, J.; See, C.; Shaffer, M.: Characterisation of human serum spreading factor with monoclonal antibody.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1362-1366 (1983)
- Barnes, D.W.; Wolfe, R.; Serrero, G.; McClure, D.; Sato, G.: Effects of a serum spreading factor on growth and morphology of cells in serum-free medium.  
J. Supramol. Struct. 14, 47-63 (1980)
- Belon, P.E.: UVA exposure and pituitary secretion: variations of human lipotropin concentrations ( $\beta$ -LPH) after UVA exposure.  
Photobiol. 42, 327-329 (1985)

- Bertagna, X.: Proopiomelanocortin-derived peptides  
Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. 23, 467-485 (1994)
- Bigliardi, P.L.; Bigliardi-Qi, M.; Buechner, S.; Rufli, T.: Expression of  $\mu$ -opiate receptor in human epidermis and Keratinocytes.  
J. Invest. Dermatol. 11, 297-301 (1998)
- Bigliardi-Qi, M.; Bigliardi, P.L.; Eberle, A.N.; Buechner, S.; and Rufli, T.:  
 $\beta$ -endorphin stimulates cytokeratin 16 expression and downregulates  $\mu$ -opiate receptor expression in human epidermis.  
J. Invest. Dermatol. 114, 527-532 (2000)
- Bos, J.D.: Skin immune system (SIS).  
CRC Press, Boca Raton, FL (1997)
- Boukamp, P.; Petrussevska, R.T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N.E.: Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.  
J. Cell. Biol. 106, 761-771 (1988)
- Bradbury, A.F.; Smyth, D.G.; Snell, C.R.; Birdsall, N.J.; Hulme, E.C.: C fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors.  
Nature 260, 793-795 (1976)
- Bronson, R.A.; Preissner, K.T.: Measurement of vitronectin content in human spermatozoa and vitronectin concentrations within seminal fluid.  
Fertil. Steril. 68, 709-713 (1997)
- Brown, C.; Stenn, K.S.; Falk, R.J.; Woodley, D.T.; O'Keefe, E.J.: Vitronectin: Effects on keratinocyte motility and inhibition of collagen induced motility.  
J. Invest. Dermatol. 96, 724-728 (1991)



- Brownstein, M.J.: A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5391-5393 (1993)
- Brzoska, T.; Scholzen, T.; Becher, E.; et al.: UVB irradiation regulates the expression of proopiomelanocortin, prohormone convertase 1 and melanocortin receptor 1 by human keratinocytes.  
J. Invest. Dermatol. 108, 622a (1997)
- Burt, D.R.: Criteria for receptor identification.  
In: Neurotransmitter Receptor Binding (Yamamura, Enna, and Kuhar, eds)  
Raven Press, New York. 41-55 (1978)
- Calabrese, V.P.; Gruemer, H.D.; Tripathi, H.L.; Dewwy, W.; Fortner, C.A.;  
Delorenzo, R.L.: Serum cortisol and cerebrospinal fluid  $\beta$ -endorphin in status epilepticus. Their possible relation to prognosis.  
Arch. Neurol. 50, 689-693 (1993)
- Cardin, A.D.; Weintraub, H.J.R.: Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions.  
Arteriosclerosis 9; 21-31 (1989)
- Carr, D.J.J.; Kimpel, G.R.: Enhancement of the generation of cytotoxic T cells by endogenous opiates.  
J. Neuroimmunol. 12, 75-87 (1986)
- Carriero, M.V.; Del Vecchio, S.; Franco, P.; Potena, M.I.; Chiaradonna, F.; Botti, G.:  
Vitronectin binding to urokinase receptor in human breast cancer.  
Clin. Cancer Res. 3, 1299-1308 (1997)
- Castro, M.G.; Morrison, E.: Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain.  
Crit. Rev. Neurobiol. 11, 35-57 (1997)

- Chain, D., Kreizman, T., Shapira, H., Shaltiel, S.: Plasmin cleavage of vitronectin: Identification of the site and consequent attenuation in binding plasminogen activator inhibitor-1.  
FEBS Lett 285; 251-256 (1991)
- Chakraborty, A.K.; Funasarka, Y.; Slominski, A.; Bolognia, J.; Sodi, S.; Ichihashi, M.; Pawelek, J.M.: UV-light and MSH receptors.  
Ann. NY. Acad. Sci. 885, 41-56; 885, 100-116 (1999)
- Chakraborty, A.K.; Funasarka, Y.; Slominski, A.; Ermak, G.; Hwang, J.; Pawelek, J.M.; Ichihashi, M.: Production and release of proopiomelanocortin (POMC-) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: Regulation by UVB.  
Biochem. Biophys. Acta 1313, 130-138 (1996)
- Chakraborty, A.K.; Slominski, A.; Ermak, G.; Hwang, J.; Pawelek, J.M.: Ultraviolet B and melanocyte-stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for  $\alpha$ MSH receptors and proopiomelanocortin-derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes.  
J. Invest. Dermatol. 105, 655-659 (1995)
- Cheresh, D.A.; Smith, J.W.; Cooper, H.M.; Quaranta: A novel vitronectin receptor integrin ( $\alpha_v\beta_3$ ) is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells.  
Cell 57, 59 (1989)
- Cheresh, D.A.; Spiro, R.C.: Biosynthesis and functional properties of an RGD-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen and von Willebrand factor.  
J. Biol. Chem. 262, 17703 (1987)

- Chhatwal, G.S.; Preissner, K.T.; Müller-Berghaus, G.; Blobel, H.: Specific binding of the human S-Protein (Vitronectin) to Streptococci, Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Infection and Immunity 55, 1878-1883 (1987)
- Childers, S.T.: Opioid receptor-coupled second messenger system. Life Sci 48, 1991-2003 (1991)
- Chu, A.C.; Patterson, J.A.K.; Berger, C.L.; Takezaki, S.; Edelson, R.L.: Thymopoietin-like substance in human skin. J.Invest. Dermatol. 81, 194-197 (1983)
- Clements, J.A.; Funder, J.W.; Tracy, K.; Morgan, F.J.; Campbell, D.J.; Lewis, P.; Hearn, M.T.W.: Adrenocorticotropin,  $\beta$ -endorphin, and lipotropin in normal thyroid and lung: possible implications for ectopic hormone secretion. Endocrinology 111, 2097-2102 (1982)
- Cohen, M.R.; Picar, D.; Exstein, I.; Gold, M.S.; Swedney, D.R.: Plasma cortisol and beta-endorphin immunoreactivity in nonmajor and major depression. American. J. Psych. 141, 628-632 (1984)
- Colan, M.G.; Tomasini, B.R.; Schultz, R.L.; Mosher, D.F.: Plasma vitronectin polymorphism in normal subjects and patients with disseminated intravascular coagulation. Blood 72, 185-190 (1988)
- Csontos, K.; Rust, M.; Höllt, V.; Mahr, W.; Kromer, W.; Teschemacher, H.: Elevated plasma  $\beta$ -Endorphin level in pregnant woman and their neonates. Life Sci. 25, 835-844 (1979)

- Dahlbäck, K.; Löfberg, H.; Alumets, J.; Dahlbäck, B.: Immunochemical demonstration of age-related deposition of vitronectin (S-protein of complement) and terminal complement complex on dermal elastic fibers.  
J. Invest. Dermatol. 92, 727-733 (1989)
- Dahlbäck, K., Löfberg, H., Dahlbäck, B.: Localization of vitronectin (S-protein of complement) in human skin.  
Acta Derm. Venerol. 66, 461-467 (1986)
- Deakin, J.F.W.; Doströvsy, J.O.; Smyth, D.G.: Influence of N-terminal acetylation and C-terminal proteolysis and analgetic activity of  $\beta$ -endorphin.  
Biochem. J. 189, 501-506 (1980)
- De Boer, H.C., Preissner, K.T., Bouma, B.N., Groot, P.G.: Binding of vitronectin-thrombin-antithrombin III complex to human endothelial cells is mediated by the heparin binding site of vitronectin.  
J. Biol. Chem. 267; 2264-2268 (1992)
- De Bold, C.R.; Nicholson, W.E.; Orth, D.N.: Immunoreactive proopiomelanocortin (POMC) peptides and POMC-like messenger ribonucleic acid are present in many rat nonpituitary tissues.  
Endocrinology 66, 2648-2657 (1988)
- Declerck, P.J.; De Mol, M.; Alessi, M.; Baunzder, S. ; Paquer, E.; Preissner, K.T.; Müller-Berghaus, G.; Collen: Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S-protein (vitronectin).  
J. Biol. Chem. 263, 15454-15461 (1988)
- Diaz, J.A.; Reichert, L.E.: Characterization of a follitropin-binding component prepared from immature bovine testes in absence of detergent.  
J. Biol. Chem. 257, 613-620 (1982)

Dinareello, C.A.: Interleukin-1.

Ann. NY Acad. Sci. 546:122-132 (1988)

Duthie, M.S.; Kimber, I.; Norval, M.: The effects of ultraviolet radiation on the human immun system.

Br. J. Dermatol. 140, 995-1009 (1999)

Eipper, B.A., and Mains, R.E.: Further analysis of post-translational processing of  $\beta$ -endorphin in rat intermediate pituitary.

J. Biol. Chem. 256, 5689-5695 (1981)

Eipper, B.A., and Mains, R.E.: Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides.

Endocrine Rev. 1, 1-27 (1980)

Evans, C.J.; Edelyi, E.; Weber, E.; Barchas, J.D.: Identification of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the human adrenal medulla.

Science 221, 957-960 (1983)

Evans, C.J.; Keith, D.E.; Morrison, H.; Magendzo, K.; Edwards, R.H.:

Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.

Science 258, 1952-1955 (1992)

Farooqui, J.Z.; Medrano, E.E.; Abdel-Malek, Z.; Nordlund, J.:

The expression of proopiomelanocortin and various POMC-derived peptides in mouse and human skin.

Ann. NY. Acad. Sci. 680, 508-510 (1993)

Felding-Habermann, B.; Müller, B.M.; Romerdahl, C.A.; Chresh, D.A.: Involvement of integrin  $\alpha_v$  gene expression in human melanoma tumorigenicity.

J. Clin. Invest. 89, 2018-2022 (1992)

Gates, M.; Tschudi, G: The synthesis of morphine.

J. Amer. Chem. Soc. 74, 1109-1114 (1952)

- Gilmore, W.; Weiner, L.P.:  $\beta$ -Endorphin enhances interleukin-2 (IL-2) production in murine lymphocytes.  
J. Neuroimmunol. 18, 125 (1988)
- Glinski, W., Brodecka, H., Glinska-Ferenz, M., Kowalski, D.: Increased concentration of  $\beta$ -endorphin in sera of patients with psoriasis and other inflammatory dermatosis.  
Acta Derm. Venerol. 75, 9-11 (1995)
- Glinski, W.; Brodeck, H.; Glinsk-Ferenz, M.; Kowalski, D.: Neuropeptides in psoriasis: Possible role for  $\beta$ -endorphin in the pathomechanism of the disease.  
Int. J.Dermatol. 33, 356-360 (1994)
- Goldstein, A.; Tachibana, S.; Lowney, L.I.; Hunkpiller, M.; Hood, L.: Dynorphin (1-13) - an extraordinary potent opioid peptide.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 6666-6670 (1979)
- Goodwin, G.M.; Austin, M.P.; Curran, S.M.; Ross, M.; Murray, C.; Prentice, N.; Ebmeier, K.P.; Bennie, J.; Carrol, S.; Dick, H.: The elevation of plasma  $\beta$ -endorphin levels in major depression.  
J. Affect. Disord. 29, 281-289 (1993)
- Grewe, M.; Gyufko, K.; Krutmann, J.: Interleukin-10 production by cultured human keratinocytes: regulation by ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation.  
J. Invest. Dermatol. 104, 3-6 (1995)
- Greiter, F.; Bachl, N.; Prokop, L.; Müller, M.; Kreuzer, W.: UV conditioning: Physical and physiological impact.  
Curr. Probl. Derm. 15, 282-285 (1986)
- Guettier, C.; Hinglais, N.; Bruneval, P.; Kazatchkine, M.; Bariety, J.; Camilleri, J-P.: Immunohistochemical localization of S-protein/vitronectin in human atherosclerosis versus arteriosclerotic arteries.  
Virchows Arch. A. Pathol. Anat. 414, 309-313 (1989)

- Gulland, J.M.; Robinson, R.: The morphine group. Part I. A discussion of the constitutional problem  
J. Chem. Soc. 123, 980-987 (1923)
- Hayman, E.G.; Pierschbacher, M.D.; Suzuki, S.; Rozuslahti, E.: Serum spreading factor (Vitronectin) is present at cell surface and in tissues.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4003-4007 (1983)
- Hayman, E.G.; Pierschbacher, M.D.; Suzuki, S.; Rozuslahti, E.: Vitronectin - a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum.  
Exp. Cell Res. 160, 245-258 (1985)
- Hazum, E.; Chang, K.; Cuatrecasas, P.: Specific nonopiate receptors for  $\beta$ -endorphin.  
Science 205, 1033-1035 (1979)
- Heitkamp, H.C.; Schmid, K.; Scheib, K.:  $\beta$ -endorphin and adrenocorticotrophic hormone production during marathon and incremental exercise.  
Eur. J. Appl. Physiol. 66, 269-274 (1993)
- Hennig, J.; Laschewski, U.; Opper, C.: Biophysiological changes after bungee jumping:  $\beta$ -endorphin immunoreactivity as a mediator of euphoria?  
Neuropsychobiology 29, 28-32 (1994)
- Hetland, G.; Pettersen, H.B.; Mollnes, T.E.; Johnson, E.: S-protein is synthesized by human monocytes and macrophages in vitro.  
Scand. J. Immunol. 29, 15-21 (1989)
- Higazi, A.A-R.; Upson, R.H.; Cohen, R.L.; Manupello, J.; Bognacki, J.; Henkin, J.: Interaction of single-chain urokinase with its receptor induces the appearance and disappearance of binding epitopes within the resultant complex for other cell surface proteins.  
Blood 88, 542-551 (1996)

- Hildebrand, A., Preissner, K.T., Müller-Berghaus, G.; Teschemacher, H.:  
A novel  $\beta$ -endorphin binding protein.  
J. Biol. Chem. Vol. 264, 15429-15434 (1989)
- Hildebrand, A.: Charakterisierung und Identifizierung von S-Protein (= Vitronectin) als  
spezifisches Bindungsprotein im Plasma des Menschen.  
Med. Diss. JLU Gießen (1988)
- Hildebrand, A.: Identification of the  $\beta$ -endorphin-binding subunit of the SC5b-9  
complement complex: S-protein exhibits specific  $\beta$ -endorphin-binding  
sites upon complex formation with complement proteins.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 799-806 (1989)
- Hildebrand, A.; Schweigerer, L.; Teschemacher, H.: Characterisation and  
identification of heparin-induced nonopioid-binding sites for  $\beta$ -endorphin  
in human plasma.  
Biol. Chem. 263, 2436-2441 (1988)
- Holmes, R.: Preparation from human serum of an alpha-one protein which induces  
the immediate growth of unadapted cells in vitro.  
J. Cell. Biol. 32, 297-308 (1975)
- Huges, J.; Smith, T.; Kosterlitz, H.; Fothergill, L.; Morgan, B.; Morris, H.:  
Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate  
agonist activity.  
Nature 258, 577-579 (1975)
- Humphries, M.J.; Olden, K.; Yamada, K.M.: A synthetic peptide from fibronectin  
inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells.  
Science 233, 467-470 (1986)
- Hunter, W.M.; Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth  
hormone of high specific activity.  
Nature 194, 495-496 (1962)



Ill, C.R.; Rozuslahti, E.: Association of thrombin-antithrombin III complex with vitronectin in serum.

J. Biol. Chem. 260, 15610-15615 (1985)

Illes, P.: Analgetika und Antiphlogistika

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

7. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)

Jaffe, E.A.; Hoyer, L.W.; Nachman, R.L.: Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1906-1909 (1974)

Jaffe, E.A.; Mosher, D.F.: Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells.

J. Exp. Med. 147, 1779-1791 (1978)

Jenne, D.; Hugo, F.; Bhakdi, S.: Interaction of S-protein with thrombin-antithrombin complex: A role for the S-protein in haemostasis.

Thromb. Res. 38, 401-412 (1985)

Jenne, D.; Stanley, K.K.: Nucleotide sequence and organization of the human S-protein gene: Repeating peptide motifs in the „pexin“ family and a model for their evolution.

Biochemistry 26; 6735-3742 (1987)

Jenne, D.; Stanley, K.K.: Molecular cloning of S-Protein, a link between complement, coagulation and cell-substrate adhesion.

EMBO J. 4, 3153-3157 (1985)

Johnson, H.M.; Smith, E.M.; Torres, B.A.; Blalock, J.E.: Regulation of the in vitro antibody response by neuroendocrine hormones.

Proc. Natl. Acad. Sci., USA 79, 4171-4174 (1982)

- Kaiser, E.T.; Kèzdy, F.J.: Amphiphilic secondary structure: Design of peptide hormones.  
Science 223, 249-255 (1984)
- Kamei, J.; Iwamoto, Y.; Misawa, M.; Nagase, H.; Kasuya, Y.: Antitussive effect of  $\beta$ -endorphin is mediated by mu-opioid receptors, but not by kapa- or epsilon opioid receptors.  
Eur. J. Pharmacol. 233, 251-254 (1993)
- Kemkes-Matthes, B.; Preissner, K.T.; Langenscheidt, F.; Matthes, K.J.; Müller-Berghaus, G.: S-protein/vitronectin in chronical liver diseases: Correlations with serum cholinesterase, coagulation factor X and complement component C3.  
Eur. J. Haematol. 257, 161-165 (1987)
- Kho, H.G.; Kloppenborg, P.W.; van Egmond, J.: Effects of accupuncture and transcutaneous stimulation analgesia on plasma hormone levels during and after abdominal surgery.  
Eur. J. Anaesthesiology 10, 197-208 (1993)
- Kiefer, B.L.; Befort, K.; Gaveriaux-ruff, C.; Hirth, C.G.: The  $\delta$ -opioid receptor: Isolation of cDNA by expression cloning and pharmacological characterisation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 12048-12052 (1992)
- Kitagaki-Ogawa, H.; Yatohgo, T.; Hayashi, M.; Kashiwagi, H.; Matsumoto, I.; Seno, N.: Diversities in animal vitronectin. Differences in molecular weight, immunoreactivity and carbohydrate chains.  
Biochim. Biophys. Acta 1033, 49-56 (1990)
- Knapp, R.J.; Malatynska, E.; Collins, N.; Fang, L.; Wang, J.Y.; Hruby, V.J.; Roeske, W.R.; Yamamura, H.I.: Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors.  
FASEB J. 9, 516-525 (1995)

- Köck, A.; Schwarz, T.; Kirnbauer, R.; Urbanski, A.; Perry, P.; Ansel, J.C.; Luger, T.  
A.: Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor  $\alpha$   
evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or  
UV light.  
J. Exp. Med. 172, 1609-1614 (1990)
- Kolb, W.P.; Müller-Eberhard, H.J.: The membrane attack mechanism of  
complement. Isolation and subunit composition of the C5b-9 complex.  
J. Exp. Med. 141, 724-735 (1975)
- Kondo, S.: The role of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their  
possible response to UVA radiation.  
J. Invest Dermatol. Symp. Proc. 4, 177-183 (1999)
- Kost, C.; Stüber, W.; Ehrlich, H.; Pannekoek, H.; Preissner, K.T.: Mapping of binding  
sites for heparin, plasminogen activator inhibitor-1 and plasminogen to  
vitronectin's heparin binding region reveals a novel vitronectin-  
dependent feedback for the control of plasmin formation.  
J. Biol. Chem. 267, 12098-12105 (1992)
- Kupper, T.S.; Coleman, D.L.; McGuire, J.; Goldminz, D.: Keratinocyte-derived T-  
cell growth factor: A T-cell growth factor functionally distinct from  
interleukin 2.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4451-4455 (1986)
- Larsson, E.L.; Iscove, N.N.; Coutinho, A.: Two distinct factors are required for  
induction of T-cell growth.  
Nature 283, 664-666 (1980)
- Levins, P.C.; Carr, D.B.; Fisher, J.E.; Momtaz, K.; Parrish, J.A.:  
 $\beta$ -endorphin and  $\beta$ -lipotropin response to ultraviolet radiation.  
Lancet 2, 166 (1983)

- Li, C.H.; Chung, D.; Doneen, B.A.: Isolation, characterisation and opiate activity of  $\beta$ -Endorphin from human pituitary glands.  
Biochem. Biophys. Res. Com. 72, 1542-1547 (1976)
- Li, C.H.: Synthetic analogs and structure-activity relationships.  
Hormonal Proteins and Peptides 10, 1-34 (1981)
- Liang, O.D.; Preissner, K.D.; Chhatwal, G.S.: The hemopexin-type repeats of human vitronectin are recognized by streptococcus pyogenes.  
Biochem Biophys Res Commun 234; 445-459 (1997)
- Liang, O.D.; Rosenblatt, S.; Chhatwal, G.S.; Preissner, K.T.: Identification of novel heparin-binding domains of vitronectin.  
FEBS Lett 407; 169-172 (1997)
- Lim, A.T.; Lolait, S.; Barlow, J.W.; Waisum, O.; Zois, I.; Toh, B.H.; Funder, J.W.:  
Immunoreactive  $\beta$ -Endorphin in sheep ovary.  
Nature 303, 709-711 (1983)
- Liotta, A.S.; Krieger, D.T.: In vitro biosynthesis and comparative post-translational processing of immunoreactive precursor corticotropin/ $\beta$ -endorphin by human placenta and pituitary cells.  
Endocrinology 106, 1504-1511 (1980)
- Loh, H.H.; Tseng, L.F.; Wei, E.; Li, C.H.:  $\beta$ -Endorphin is a potent analgetic agent.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2895-2898 (1976)
- Luger, T. Paus, R.; Slominski, A.; Lipton, J.: Cutaneous neuromodulation:  
The proopiomelanocortin system.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 885, 1-479 (1999)

- Luger, T.A.; Scholzen, T.; Brzoska, T.; Becher, E.; Slominski, A.; Paus, R.:  
Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress responses  
by  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone.  
Ann. NY. Acad. Sci. 840, 381-384 (1998)
- Luger, T.A.; Stadler, B.M.; Katz, S.I.; Oppenheim, J.J.: Epidermal cell- (keratinocyte-)  
derived thyrocyte activating factor (ETAF).  
J. Immunol. 127, 1493-1498 (1981)
- Mack, M.; Kleinschmidt, A.; Brühl, H.; Klier, C.; Nelson, P.J.; Cihak, J.; Plachy, J.;  
Stangassinger, M.; Erele, V.; Schlöndorff, D.: Transfer of the chemokine  
receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A  
mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection.  
Nature Medicine 6, 769-775 (2000)
- Macoli, M.; Ricevoti, G.; Mazzone, A.; Pasotti, D.; Lecchini, S.; Frigo, G.M.:  
A stereoselective blockade by naloxone by opioid and non-opioid-  
induced granulocyte activation.  
Int. J. Immunopharmacol. 11, 57-61 (1989)
- Malcolm, D.S.; Holaday, J.W.: Opioid peptides and their antagonists: A role in  
respiratory function.  
Seminars in Respir. Med. 7, 81-87 (1985)
- Mandler, R.N.; Biddison, W.E.; Mandler, R.; Serrate, S.A.:  $\beta$ -endorphin augments the  
cytolytic activity and interferon production of natural killer cells.  
J. Immunol. 136, 934-939 (1986)
- Marguerie, G.A.; Ardaillou, N; Cherel, G.; Plow, E. F.: The binding of fibrinogen  
to its platelet receptor.  
J. Biol. Chem. 257, 11872-11875 (1982)

- McCain, H.W.; Lamster, I.B.; Bozzone J.M.; Gribic, J.T.:  $\beta$ -Endorphin modulates human immune activity via non-opiate receptor mechanisms.  
Life Sci 31:1619 (1982)
- McLean, J.W.; Vestal, D.J.; Cheresh, D.A.; Bodary, S.C.: cDNA sequence of the human integrin  $\beta$ 5 subunit.  
J. Biol. Chem. 265, 17126 (1990)
- Mudson, P.J.; Rodbard, D.: Ligand. A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding system.  
Anal. Biochem. 107, 220-239 (1980)
- Murphy, P.M.; Baggiolini, M.; Charo, I.F.; Hebert, C.A.; Horuk, R.; Matsushima, K.; Miller, L.H.; Oppenheim, J.J.; Power, C.A.: International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors.  
Pharmacol. Rev. 52, 145-176 (2000)
- Nagahama, M.; Funasaka, Y.; Fernandez-Frez, M.L.; Ohaski, A.; Chakroborty, A.K.; Ueda, M.; Ichihashi, M.: Immunoreactivity of  $\alpha$ - melanocyte-stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone and  $\beta$ -endorphin in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi.  
Br. J. Dermatol. 138, 981-985 (1998)
- Niculescu, F.; Rus, H.G.; Vlaicu, R.: Immunohistochemical localization of C5b-9, S-protein, C3d and apolipoprotein B in human arterial tissue with atherosclerosis.  
Atherosclerosis 65, 1-11 (1987)
- Nissen, J.B.; Kragballe, K.: Enkephalins modulate differentiation of normal keratinocytes in vitro.  
Exp. Dermatol. 6, 222-229 (1997)

- Oates, E.L.; Allaway, G.P.; Armstrong, G.R.; Boyajian, R.A.; Kehrl, J.H.; Prabhakar, B.S.: Human lymphocytes produce proopiomelanocortin gene-related transcripts. Effects of lymphotropic viruses.  
J. Biol. Chem. 263, 10041-10044 (1988)
- Oppenheim, J.J., Kovacs, E.J., Matsushima, K., Durum, S.K.:  
Immunol. Today 7: 45-56 (1988)
- Orlow, S.J.; Chakraborty, A.K.; and Pawelek, J.M.: Retinoic acid is a potent inhibitor of inducible pigmentation in mouse and hamster melanoma cells.  
J. Invest. Dermatol. 94, 129-136 (1990)
- Oyama, T.; Jin, T.; Yamaya, R.; Ling, N.; Guillemin, R: Profound analgetic effects of  $\beta$ -endorphin in man.  
Lancet 1, 122-124 (1980)
- Pert, C.B.; Snyder, S.H.: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue.  
Science 179, 1011-1014 (1973)
- Peterson, P.K.; Sharp, B.M.; Gekker, G.; Brummit, C.; Keane, W.F.:  
Opioid mediated suppression of interferon-gamma production by cultured peripheral blood mononuclear cells.  
J. Clin. Invest. 80, 824-831 (1987)
- Podack, E.R.; Dahlbäck, B. and Griffin, J.H.: Interaction of S-protein of complement with thrombin and antithrombin III during coagulation.  
J. Biol. Chem. 261, 7387-7392 (1986)
- Podack, E.R.; Müller-Eberhard, H.J.: Isolation of human S-protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement.  
J. Biol. Chem. 254, 9908-9914 (1979)

- Pohl, W.R.; Colan, M.G.; Thompson, A.B.; Ertl, R.F.; Romberger, D.J.; Mosher, D.F.; Rennard, S.I.: Vitronectin in bronchoalveolar lavage fluid is increased in patients with interstitial lung disease.  
Am. Rev. Respir. Dis. 143, 1369-1373 (1991)
- Poloczek, A.: Nachweis der Koloalation der  $\beta_H$ -Endorphin(1-31)-Bindungsstelle mit dem Chemokinrezeptor CCR5 auf Monozyten der Zelllinie THP-1.  
Med. Dissertation der JLU Gießen (eingereicht 2002)
- Preissner, K.T.: S-Protein (Vitronectin): Die Rolle des multifunktionellen Adhäsions-Proteins im Gerinnungs- und Komplementsystem an der Interphase Blut-Gefäßwand.  
Hämostaseologie, F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (1988)
- Preissner, K.T.; Anders, E.; Grunlich-Henn, J.; Müller-Berghaus, G.: Attachment of cultured human endothelial cells is promoted by specific association with S-protein (vitronectin) as well as with the ternary S-protein-thrombin-antithrombin III complex.  
Blood 71, 1581-1589 (1988)
- Preissner, K.T.; Heimbürger, N.; Anders, E.; Müller-Berghaus, G.: Physiochemical, immunochemical and functional comparison of human S-protein with vitronectin. Evidence for the identity of both plasma proteins.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 951-956 (1986)
- Preissner, K.T.; Müller-Berghaus, G.: Neutralization and binding of heparin by S-protein/vitronectin in the inhibition of factor Xa by antithrombin III. Involvement of an inducible heparin binding domain of S-protein/vitronectin.  
J. Biol. Chem. 262, 12247-12253 (1987)
- Preissner, K.T.; Seiffert, D.: Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling.  
Thromb. Res. 89, 1-21 (1998)



- Preissner, K.T.; Wassmuth, R.; Müller-Berghaus, G.: Physicochemical characterization of human S-protein and its function in the blood coagulation system.  
Biochem. J. 231, 349-355 (1985)
- Preissner, K.T.; Zwicker, L.; Müller-Berghaus, G.: Formation, characterization and detection of a ternary complex between S-protein, thrombin and antithrombin III in serum.  
Biochem. J. 243, 105-111 (1987)
- Puppo, F., Corsini, G., Mangini, P., Bottaro, L., Barreca, T.: Influence of  $\beta$ -endorphine on Phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation and on expression of monocellular cell surface antigen in vitro.  
Immunopharmacology 10:119 (1985)
- Ramaswamy, H.; Hemler, M.E.: Cloning, primary structure and properties of a novel human integrin  $\beta$  subunit.  
EMBO J. 9, 1561 (1990)
- Rosenblatt, S.; Bassuk, J.A.; Alpers, C.E.; Sage, E.H.; Timpl, R.; Preissner, K.T.: Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counteradhesive proteins: Characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC).  
Biochem. J. 324, 311-319 (1997)
- Sacerdote, P.; Panerai, A.E.: Analysis of  $\beta$ -endorphin structure-related activity on human monocyte chemotaxis: Importance of the N- and C-terminal.  
Peptide 10, 565-569 (1989)
- Sanders, L.C.; Felding-Habermann, B.; Müller, B.M.; Cherish, D.A.: Role of  $\alpha_v$  integrins in human melanoma cell growth.  
Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology 57 (1992)

- Sauder, D.N.; Carter, C.S.; Katz, S.I.; Oppenheim, J. J.: Epidermal cell production of thymocyte activating factor (ETAf).  
J.Invest. Dermatol. 79, 34-39 (1982)
- Savill, J.; Dransfield, I.; Hogg, N.; Haslett, C.: Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis.  
Nature 343, 180-183 (1990)
- Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949)
- Schauer, E.; Trautinger, F.; Kock, A.; Schwarz, A.; Bhadwai, R.; Ansel, J.C.; Luger, T.A.: Proopiomelanocortin derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes.  
J. Clin. Invest. 93, 2258-2262 (1994)
- Scholzen, T.E.; Brzoska, T.; Kalden, D.-H., O'Reilly, F.O.; Armstrong, C.A.; Luger, T.A.; Ansel, J.C.: Effect of ultraviolet light on the release of neuropeptides and neuroendocrine hormone in the skin: Mediators of photodermatitis and cutaneous inflammation.  
J. Invest. Dermatol. Symp. Proc. 4, 55-59 (1999)
- Scholzen, T.; Hartmeyer, M.; Fastrich, M.; Brzorka, T.; Becher, E.; Schwarz, T.; Luger, T.A.: Ultraviolet light and Interleukin-10 modulate expression of cytokines by transformed human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1).  
J.Invest. Dermatol. 11, 50-56 (1998)
- Schüle, R.; Liebenhoff, U.; Müller, H.; Birnbaumer, M.; Rosenthal, W.: Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site directed mutagenesis of its putative palmitoylation site.  
Biochem. J. 313, 611-616 (1996)

- Schweigerer, L., Bhakdi, S.; Teschemacher, H.: Specific nonopiate binding sites for human  $\beta$ -endorphin on the terminal complex of human complement. *Nature* 296, 572-574 (1982)
- Schweigerer, L.; Schmidt, W.; Teschemacher, H.; Gramsch, C.:  $\beta$ -endorphin: Surface binding and internalization in thymoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5751-5755 (1985)
- Schweigerer, L.; Schmidt, W.; Teschemacher, H.; Wilhelm, S.:  $\beta$ -endorphin: Interaction with specific non-opioid binding sites on EL4 thymoma cells. *Neuropeptides* 6, 445-452 (1985)
- Schweigerer, L.; Teschemacher, H.; Bhakdi, S.; Lederle, M.: Interaction of human  $\beta$ -endorphin with non-opiate binding site on the terminal SC5b-9 complex of human complement. *J. Biol. Chem.* 258, 12287-12292 (1983)
- Seiffert, D.; Geisterfer, M.; Gauldie, J.; Young, E.; Podor, T. J.: IL-6 stimulates vitronectin gene expression in vivo. *J. Immunol.* 155, 1380-3185 (1995)
- Seiffert, D.: Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol. Histopathol.* 12, 787-797 (1997)
- Sertürner, F.W.A.: Säure im Opium. *J. Pharmacie Erfurt* 13, 229-243 (1805)
- Shahabi, N.A.; Linner, K.M.; Sharp, B.M.: Murine splenocytes express a naloxon insensitive binding site for  $\beta$ -endorphin. *Endocrinology* 126, 1442-1448 (1990)

- Sharp, B.M.; Keane, W.F.; Suh, H.J.; Gekker, G.; Tsukayama, D.; Pterson, P.K.:  
Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages.  
Endocrinology 117, 793-795 (1985)
- Shimizu, T.; Abe, R.; Ohkawars, A.; Nishihira, J.: Ultraviolet B radiation upregulates the production of microphage migration inhibitory factor (MIF) in human epidermal keratinocytes.  
J. Invest. Dermatol. 112, 210-215 (1999)
- Shifman, M.A. and Pizzo, S.V.: The in vivo metabolism of antithrombin III and antithrombin III complexes.  
J. Biol. Chem. 414-416 (1982)
- Sibinga, N.E.S.; Goldstein, A.: Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system  
Annu. Rev. Immunol. 6, 219-249 (1988)
- Simon, E.J.; Hiller, J.M.; Edelmann, I.: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [3H]-Etorphine to rat-brain homogenate.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1947-1949 (1973)
- Sjanchez-Franco, F.; Patel, Y.C.; Reichlin, S: Immunoreactive ACTH in the gastrointestinal tract and panceatic islets of the rat.  
Endocrinology 108, 2235-2238 (1981)
- Skov, L.; Hansen, H.; Allen, M.; Villadsen, L.; Norval; M.; Barker, J.N.W.N.; Simon, J.; Baadsgaard, O.: Contrasting effects of ultraviolet UV A1 radiation ultraviolet B exposure on the induction of tumour necrosis factor  $\alpha$  in human skin.  
Br. J. Dermatol. 138, 216-220 (1998)

- Slominski, A.; Ermak, G.; Hwang, J.; Chakraborty, A.; Mazurkiewics, J.E.; Mihm, M.: Proopiomelanocortin, corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone receptor genes are expressed in human skin.  
FEBS Lett 374: 113-116, 1995
- Slominski, A.; Mihm, M.: Potential mechanism of skin response to stress.  
Int. J. Dermatol. 35, 849-851 (1996)
- Slominski, A.; Paus, R.; Wortsman, J.: On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology.  
Mol. Cell. Endocrinol. 93, C1-C6 (1993)
- Slominski, A.; Pawelek, J.: Animals under the sun: effects of the ultraviolet radiation on mammalian skin.  
Clin. Dermatol. 16, 503-515 (1998)
- Slominski, A.; Wortsman, J.: Neuroendocrinology of the skin.  
Endocrine Rev. 21, 457-487 (2000)
- Slominski, A.; Wortsman, A.J.; Mazurkiewicz, J.E.; Matsuoka, D.; Dietrich, J.; Lawrence, K.; Gorbini, A.; Paus, R.: Detection of the proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic human skin.  
J. Lab. Clin. Med. 122, 658-666 (1993)
- Slominski, A.; Wortsman, J.; Paus, R.; Luger, T.; Salomon, S.: Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress.  
Physiol. Rev. 80, 979-1020 (2000)

- Smith, J.W.; Vestal, D.J.; Irwin, S.V.; Burke, T.A.; Cheresch, D.A.: Purification and functional characterization of integrin  $\alpha_v\beta_5$ : An adhesion receptor for vitronectin.  
J. Biol. Chem. 265, 11088 (1990)
- Stanley, K.K.: Homology with hemopexin suggests a possible scavenging function of S-protein/vitronectin.  
FEBS Lett. 199, 249-253 (1986)
- Starke, K.: Peptide: Opioide  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie  
7. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- Starke, K.: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie  
7. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- Streilein, J.W.; Alard, P.; Niizeki, H.: A new concept of skin – associated lymphoid tissue (salt): UVB light impaired cutaneous immunity reveals a prominent role for cutaneous nerves.  
Keio J. Med. 48, 22-27 (1997)
- Stenn, K.S.: Epibolin: A protein of human plasma that supports epithelial cell movement.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6907-6911 (1981)
- Suzuki, S.; Oldberg, A.; Hayman, E.G.; Pierschbacher, M.D.; Rozuslahti, E.:  
Complete amino acid sequence of vitronectin deduced from cDNA.  
Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin  
EMBO J. 4, 2519-2524 (1985)

- Terenius, L.: Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex.  
Acta Pharmacol. Toxicol. 32, 317-320 (1973)
- Teschemacher, H.: Opioidrezeptoren und Opioidpeptide.  
Pharmazeutische Zeitung 132, 556-567 (1987)
- Teschemacher, H.: Atypical opioid peptides.  
In: Opioids I. Handbook of experimental Pharmacology, Vol. 104/I. Ed.: Herz, A. (1993)
- Teschemacher, H.; Koch, G.; Scheffler, H.; Hildebrand, A.; Brandl, V.: Opioid peptides immunological significance?  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 594, 66-77 (1990)
- Tollefsen, D.M.; Weigel, C.J.; Kabeer, M.H.: Presence of methionine or threonine at position 381 in vitronectin is correlated with proteolytic cleavage at arginine 379.  
J. Biol. Chem. 265: 9778-9781 (1990)
- Tomasini, B.R.; Mosher, D.F.: On the identity of vitronectin and S-protein: Immunological crossreactivity and functional studies.  
Blood 68, 737-742 (1986)
- Tsunoda, K.; Lee, X.P.; Watanabe, S.; Doge, K.; Akiya, Y.; Watanabe, T:  
Sex differences in respiratory and cardiovascular effects of  $\beta$ -endorphin  
Nippon Hoigaku Zasshi 47, 193-201 (1993)
- Van Epps, D.E.; Kutvirt, S.L.: Modulation of human neutrophil adherence by  $\beta$ -endorphin and met-enkephalin.  
J. Neuroimmunol. 15, 219-228 (1984)

- Van Epps, D.E.; Sarland, L.:  $\beta$ -endorphin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis.  
J. Immunol. 132, 3046-5053 (1984)
- Van Ree, J.M.; De Wied, D.; Bradbury, A.F.; Hulme, E.C.; Smyth, D.G.; Snell, C.R.:  
Introduction of tolerance to the analgetic action of lipotropin C-fragment.  
Nature 264, 792-794 (1976)
- Van Woudenberg, A.D.:  $\beta$ -endorphin and related peptides in human peripheral blood mononuclear cells: present or absent?  
Dissertation der Universität Utrecht (1991)
- Wakamatsu, K.; Graham, A.; Cook, D.; Thody, A.J.: Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor.  
Pigment Cell Res. 10, 288-297 (1997)
- Wallbridge, D.R.; Macintyre, H.E.; Gray, C.E.; Denvir, M.A.; Oldroyd, K.D.; Rae, A.P.; Cobbe, S.M.: Increase in plasma beta endorphins precedes vasodepressor syncope.  
Br. Heart J. 71; 446-448 (1994)
- Waltz, D.A.; Natkin, L.R.; Fujita, R.M.; Wie, Y.; Chapman, H.A.: Plasmin and plasminogen activator inhibitor type I promote cellular mobility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin.  
J. Clin. Invest. 100, 58-67 (1997)
- Wayner, E.A.; Orlando, R.A.; Cherish, D.A.: Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface.  
J. Cell. Biol. 113, 919 (1991)



- Werth, V.P.; Zhang, W.: Wavelength-specific synergy between ultraviolet radiation and interleukin 1 $\alpha$  in the regulation of matrix-related genes: Mechanistic role for tumor necrosis factor  $\alpha$ .  
J. Invest Dermatol. 113, 196-201 (1999)
- Westphal, M.; Li, C.H.:  $\beta$ -endorphine: Characterization of binding sites specific for the human hormone in human glioblastoma SF126 cells.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 81, 2921-2923 (1984)
- Wiedemann, K.; Teschemacher, H.: Determination of  $\beta$ -endorphin and fragments thereof in human plasma using high performance liquid chromatography and a multiple radioimmunoassay system.  
Pharmaceutical Res. 3, 142-149 (1986)
- Wintzen, M.; Gilchrest, B.A.: Proopiomelanocortin, its derived peptides and the skin.  
J. Invest. Dermatol. 106, 3-10 (1996)
- Wintzen, M.; Yaar, M.; Avila, E.; Vermeer, B.J.; Gilchrest, B.A.: Keratinocytes produce  $\beta$ -endorphin and  $\beta$ -lipotropin hormon after stimulation by UV, IL-1a or phorbol esters.  
J. Invest. Dermatol. 104, 641 (1995)
- Wintzen, M.; Yaar, M.; Burbach, J.P.H.; Gilchrest, B.A.: Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes.  
J. Invest. Dermatol. 106, 673-678 (1996)
- Wintzen, M.; Zanello, S.B.; Holick, M.F.; Wigant, V.M.; Burbach, J.P.H.; Vermeer, B.J.: Condition-dependent presence of  $\beta$ -lipotropin-like peptide in human keratinocytes.  
Peptides 21, 691-697 (2000)

- Wöhner, S.: Charakteristika der Interaktion des Opioidpeptids  $\beta$ -Endorphin mit dem multifunktionellen Adhäsivprotein Vitronectin.  
Med. Diss. der JLU Gießen (1998)
- Wöhner, S.; Preissner, K.T.; Teschemacher, H.: Characteristics of  $\beta$ -endorphin interaction with S protein/vitronectin.  
Regul. Pept./ FEB 21, 139-140 (1993)
- Wybran, J.; Appelboom, T.; Famaey, J.; Govaerts, A.: Suggestive evidence of receptors for morphine and methionine-enkephalin in human blood lymphocytes.  
J. Immunol. 123, 1068-1070 (1979)
- Young, E.; Bronstein, D.; Akil, H.: Proopiomelanotropin biosynthesis, processing, and secretion: Functional implications.  
Handbook of experimental Pharmacology, Vol. 104/I, Ed. A. Herz, Springer-Verlag (1993)
- Zagon, I.S.; Wu, Y.; McLaughlin, P.J.: The opioid growth factor, met-enkephalin, and the  $\xi$  opioid receptor are present in human and mouse skin and tonically act to inhibit Dann synthesis in the epidermis.  
J. Invest. Dermatol. 106, 490-497 (1996)

## 9 Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Katharina Thea Egeling  
 Geburtsdatum: 08.07.1974  
 Geburtsort: Bremen  
 Familienstand: ledig

### Schul Ausbildung

1980-1984 Grundschule an der Grambker Heerstraße, Bremen  
 1984-1986 Orientierungsstufe an der Landskronastraße, Bremen  
 1986-1990 Schulzentrum an der Helsinkistraße, Gymnasium, Bremen  
 1990-1993 Schulzentrum an der Bördestraße, Oberstufe, Bremen  
 Abschluß Abitur

### Freiwilliges Soziales Jahr

1993-1994 Evangelische Diakonissenanstalt, Orthopädische Klinik, Bremen

### Beruflicher Werdegang

Herbst 1994 Studienbeginn Humanmedizin  
 an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
 Herbst 1996 Physikum  
 Herbst 1997 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 Frühjahr 2000 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
  
 2000-2001 Praktisches Jahr:

1. Tertiär Chirurgie im Royal Hobart Hospital,  
University of Tasmania, Australien
2. Tertiär Innere Medizin im Evangelischen Krankenhaus  
Gießen  
(Leitung Prof. Dr. Breuer/ OA Dr. Hodapp)
3. Tertiär Anästhesiologie im Universitätsklinikum Gießen  
in den Bereichen HNO und Orthopädie  
(Leitung Prof. Dr. Hempelmann)

Abschluß

3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Mai 2001

Sept. 2001-Feb. 2003

AiP im ZKH Links der Weser, Bremen  
Abteilung für Anästhesiologie und operative  
Intensivmedizin, Notfallmedizin

Seit März 2003

Assistenzärztin im ZKH Links der Weser, Bremen  
Abteilung für Anästhesiologie und operative  
Intensivmedizin, Notfallmedizin

### **Nebentätigkeiten**

1998-1999

Assistenz in der Praxis Dr. Kozłowska in Gießen  
(Fachärztin für Dermatologie, Allergologie, Phlebologie)

### **Promotion**

07/97-09/99

Praktische Tätigkeit im Rudolf-Buchheim-Institut für  
Pharmakologie an der JLU Giessen,  
Betreuer Prof. Dr. H. Teschemacher  
Thema: Untersuchung zur funktionellen Bedeutung von  
Proopiomelanocortin-Fragmenten: Nachweis  
spezifischer Bindungsstellen für  $\beta$ -Endorphin auf

Keratinozyten und Vitronektin in  
Keratinozytenzellkulturen der Zelllinie HaCaT

## 10 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich während der Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. Sie haben entscheidend dazu beigetragen, daß diese Arbeit möglich wurde.

Ganz besonderer Dank gebührt an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. H. Teschemacher. Neben der präzisen Planung der Versuchsreihen, der Vorbereitungen für Kongresse, und der unermütlchen Korrektur meiner Dissertationsschrift möchte ich mich bei ihm ganz besonders für seine ständige Präsenz und sein immer offenes Ohr für jedes kleine Problem bedanken.

An zweiter Stelle möchte ich mich bei Beate Dickopf bedanken, die gute Seele des Labors. Ohne Beates Unterstützung wäre die Durchführung der Experimente zu dieser Arbeit kaum möglich gewesen. Es ist nahezu unmöglich alles aufzählen, was sie für mich alles getan hat. Ob es um das Bestellen von Materialien, um Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten oder Hilfe bei der Auswertung ging - Beate war immer für mich da. Neben ihr stand mir Holger Wenzlaff ebenfalls stets mit Rat und Tat zur Seite.

Birgit Hain, Alexander Poloczec und Birgit Kube danke ich besonders für die Hilfe bei der Versuchdurchführung der Bindungsversuche und der Karninchen-Immunisierung und für die schöne Zeit, die ich mit ihnen, Beate, Holger und Prof. Teschemacher im Labor verbracht habe.

Bei Helmut Müller möchte ich mich herzlich für die präzise Anzucht der Zellen und der Bereitstellung von manchmal scheinbar unmöglich großen Mengen an Zellmaterial bedanken.

Matthias Krauß und Jasmin Dzialek danke ich für die Hilfe bei der Auseinandersetzung mit Microsoft Word und MicroCal Origin, ohne sie wäre ich bestimmt des öfteren verzweifelt.

Zu guter Letzt danke ich natürlich meinen Eltern, Regine und Hermann Egeling, meinem Bruder Max und meinem Freund Andre Oeßel, die diese lange Zeit der Dissertation mit all ihren Höhen und Tiefen mitgetragen haben und mir wie selbstverständlich immer zur Seite standen.